



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

## **Detección de genes Gyr(A) y Erm(B) de resistencia antimicrobiana en cepas patógenas de *Campylobacter* spp. aisladas de canales de pollos comercializados en Lima Metropolitana**

### **TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

### **AUTOR**

**Diego Enrique ANAMPA ÁLVAREZ**

### **ASESOR**

**Juan Antonio ESPINOSA BLANCO**

**Lima, Perú**

**2020**



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Anampa D. Detección de genes Gyr(A) y Erm(B) de resistencia antimicrobiana en cepas patógenas de *Campylobacter* spp. aisladas de canales de pollos comercializados en Lima Metropolitana [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2020.

---

## Hoja de metadatos complementarios

|   |   |
|---|---|
| Código ORCID del autor                                    | <a href="https://orcid.org/0000-0002-3632-5267">https://orcid.org/0000-0002-3632-5267</a>   |
| DNI o pasaporte del autor                                 | 71463469  |
| Código ORCID del asesor                                   | <a href="https://orcid.org/0000-0003-3945-6200">https://orcid.org/0000-0003-3945-6200</a>   |
| DNI o pasaporte del asesor                                | 08740854  |
| Grupo de investigación                                    | Grupo de investigación en farmacología y toxicología veterinaria  |
| Agencia financiadora                                      | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. País de la agencia financiadora: Perú</li> <li>2. Nombre y siglas de la agencia financiadora: Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica - FONDECYT</li> <li>3. Nombre del programa financiero: Proyectos de investigación Básica</li> <li>4. Número de contrato: N° 405-2019-FONDECYT</li> </ol> |
| Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ubicación geográfica: Lima Metropolitana</li> <li>2. Coordenadas geográficas: latitud - 12.04318 y longitud -77.02824</li> </ol>  |
| Año o rango de años en que se realizó la investigación    | 2019 – 2020   |
| Disciplinas OCDE  | Ciencia veterinaria<br><a href="http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01">http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01</a>  |



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL  
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO  
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

**1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 22/12/2020**

HORA INICIO: 12:00 horas.

HORA TÉRMINO: 1:15 pm

**2. MIEMBROS DEL JURADO**

PRESIDENTE: **Blgo. Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández**

MIEMBRO: **MV. Mg. Miguel Angel Vilca López**

MIEMBRO: **MV. Dr. José Luis Rodríguez Gutiérrez**

ASESOR: **MV. Dr. Juan Antonio Espinoza Blanco**

**3. DATOS DEL TESISISTA**

APELLIDOS Y NOMBRES: **ANAMPA ÁLVAREZ, DIEGO ENRIQUE**

CÓDIGO: **13080002**

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **012181-2019-R/UNMSM**

TÍTULO DE LA TESIS: **“DETECCIÓN DE GENES Gyr(A) Y Erm(B) DE RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA EN CEPAS PATÓGENAS DE CAMPYLOBACTER spp. AISLADAS DE CANALES  
DE POLLOS COMERCIALIZADOS EN LIMA METROPOLITANA”**

**4. RECOMENDACIONES**

---

**Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:** Grabación  
archivada en:


[https://drive.google.com/file/d/1MS16VCKjfuN60v01Hc\\_FS4H0LyqCnBy/view](https://drive.google.com/file/d/1MS16VCKjfuN60v01Hc_FS4H0LyqCnBy/view)

**5. NOTA OBTENIDA: 18 (dieciocho)**

**6. PÚBLICO ASISTENTE:** (Nombre, apellido y DNI)

|  |           |                                |          |                                |
|--|-----------|--------------------------------|----------|--------------------------------|
| <b>MODERADOR</b>                           | <b>1</b>  | Luis Hoyos Sifuentes           | 41175479 | luis.hoyos@unmsm.edu.pe        |
|  | <b>2</b>  | Miryam Quevedo Urday           | 40064320 | mquevedou@unmsm.edu.pe         |
|  | <b>3</b>  | Luis Cerro Temoche             | 41341572 | lcerrot@unmsm.edu.pe           |
|  | <b>4</b>  | Víctor Hugo Castillo Doloriert | 40723051 | vcastillod@unmsm.edu.pe        |
| <b>INVITADOS POR EL TESISTA</b>            | <b>5</b>  | Karol Santisteban              | 73024411 | karol.santisteban@unmsm.edu.pe |
|  | <b>6</b>  | Antonio Ampuero Bustillos      | 06645903 | aampuerob@unmsm.edu.pe         |
|  | <b>7</b>  | Paola Vidal                    | 40795514 | paolavidal7@gmail.com          |
|  | <b>8</b>  | César Lázaro de La Torre       | 40628304 | clazarod@unmsm.edu.pe          |
|  | <b>9</b>  | Miguel Rojas                   | 42290575 | mrojasm2@unmsm.edu.pe          |
|  | <b>10</b> | Kiara Nelida Cáceres Bautista  | 75503719 | kiara.caceres@unmsm.edu.pe     |
| <b>SOLICITUD DE ASISTENCIA ESTUDIANTES</b> | <b>11</b> | Hernan Gonzales Huaranja       | 74610046 | hernan.gonzales2@unmsm.edu.pe  |
|  | <b>12</b> | Domingo Adrian Torres Nunton   | 72906079 | wtorres_57@hotmail.com         |
|  | <b>13</b> | Erwin Josue Rondón Lezameta    | 71025560 | erwin.rondon@unmsm.edu.pe      |

**FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO**

|  |
|--|
|  |
| <b>Firma</b>   |
| <b>Blgo. Dr. Maturrano Hernández Abelardo Lenin</b>                                  |
| <b>Apellidos y Nombres</b>   |
| <b>PRESIDENTE</b>  |

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>Firm</b><br> | <b>Firma</b><br> | <b>Firma</b><br> |
| <b>MV. Dr. Espinoza Blanco Juan Antonio</b>  | <b>MV. Mg. Vilca López Miguel Angel</b>   | <b>MV. Dr. Rodríguez Gutiérrez José Luis</b>  |
| <b>Apellidos y Nombres</b>   | <b>Apellidos y Nombres</b>  | <b>Apellidos y Nombres</b>  |
| <b>ASESOR DE LA TESIS</b>  | <b>MIEMBRO JURADO</b>   | <b>MIEMBRO JURADO</b>   |

### Agradecimientos:

Este trabajo fue financiado por el CONCYTEC- FONDECYT en el marco de la convocatoria "Proyecto Investigación Básica 2019-01 (número de contrato 405-2019)

A la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por brindarme desarrollo profesional y permitirme desarrollar mi tesis en su plenitud.

A mis profesores que me guiaron durante el desarrollo de mi investigación

A mis padres que me acompañaron en este largo viaje.

# CONTENIDO

---

|  |     |
|--|-----|
| Contenido .....  | ii  |
| Resumen.....   | iv  |
| Abstract.....  | v   |
| Lista de Cuadros.....  | vi  |
| Lista de Figuras.....  | vii |
| 1    Introducción .....  | 8   |
| 2    Revisión Bibliográfica .....  | 10  |
| 2.1    Campylobacter .....   | 10  |
| 2.1.1    El Genero Campylobacter .....   | 10  |
| 2.1.2    Características del Genoma de <i>Campylobacter</i> spp.....           | 12  |
| 2.1.3    Evolución de Campylobacter .....                                      | 13  |
| 2.1.4    Cultivo y detección.....  | 15  |
| 2.1.5    Estructura antigénica de <i>Campylobacter</i> spp.....                | 18  |
| 2.1.6    Variación morfológica .....   | 22  |
| 2.1.7    Reservorios de <i>Campylobacter</i> spp.....                          | 24  |
| 2.2 <i>Campylobacter</i> en la Salud Publica.....                              | 25  |
| 2.2.1    Impacto en la salud publica.....                                      | 25  |
| 2.2.2    Factores de Virulencia y Patogenia en el Hombre .....                 | 30  |
| 2.2.3    Síntomas, Complicaciones y Tratamiento en el hombre .....             | 34  |
| 2.3    Relación de <i>Campylobacter</i> con producción de carne de pollo ..... | 36  |
| 2.3.1    Producción de Carne de Pollo .....                                    | 36  |
| 2.3.2 <i>Campylobacter</i> en el Ave.....                                      | 37  |
| 2.3.3 <i>Campylobacter</i> en las instalaciones .....                          | 39  |
| 2.3.4    El Uso de Antibióticos en la Industria Animal.....                    | 42  |
| 2.4    Resistencia Antimicrobiana en Campylobacter.....                        | 46  |
| 2.4.1    Características principales.....                                      | 46  |
| 2.4.2    Evaluación de la resistencia antimicrobiana en Placa .....            | 48  |
| 2.4.3    Resistencia genética antimicrobiana en <i>Campylobacter</i> spp.....  | 48  |
| 3    Materiales y Métodos .....  | 52  |
| 3.1    Tamaño muestral.....  | 52  |
| 3.2    Análisis Microbiológico.....  | 53  |
| 3.2.1    Obtención y procesamiento de muestras .....                           | 53  |
| 3.2.2    Pre-enriquecimiento .....   | 53  |
| 3.2.3    Cultivo en agar selectivo .....                                       | 53  |
| 3.2.4    Medio no selectivo de confirmación .....                              | 54  |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.2.5 | Pruebas morfológicas y bioquímicas.....                              | 54 |
| 3.2.6 | Cepas control.....   | 56 |
| 3.3   | Confirmación Molecular .....   | 56 |
| 3.3.1 | Extracción de ADN.....   | 56 |
| 3.3.2 | PCR para análisis de género y especie .....                          | 57 |
| 3.4   | Evaluación de sensibilidad Antibiótica .....                         | 58 |
| 3.4.1 | Evaluación de la sensibilidad antibiótica .....                      | 58 |
| 3.5   | Detección de genes.....  | 58 |
| 3.5.1 | Extracción de ADN.....   | 58 |
| 3.5.2 | PCR para detección del gen <i>ermB</i> .....                         | 58 |
| 3.5.3 | PCR para detección de la mutación Thr86Ile del gen <i>gyrA</i> ..... | 59 |
| 3.5.4 | Primers Utilizados.....  | 60 |
| 3.6   | Análisis Estadístico .....   | 61 |
| 4     | Resultados .....   | 62 |
| 5     | Discusión.....   | 68 |
| 6     | Conclusión .....   | 76 |
| 7     | Recomendaciones.....   | 77 |
| 8     | Literatura citada .....  | 78 |

## RESUMEN

---

El presente estudio tiene como objetivo la detección de genes de resistencia a antibióticos *gyrA* y *ermB* en cepas de *Campylobacter spp.* aisladas de piel de pollo comercializadas en los Mercados Metropolitanos de Lima. Para proceder se tomaron muestras de 120 pieles de pollo de los mercados municipales de Lima Metropolitana (Santa Anita (20), San Martín de Porres (30) e Independencia (70)). Las muestras se sometieron a un proceso de enriquecimiento previo de 24 horas en caldo Preston a 42 ° C en un ambiente microaerófilo. Una submuestra de 100 µl se incubó en agar mCCDA durante 48 h en las mismas condiciones, una vez que se confirmó el crecimiento, las colonias se evaluaron para determinar la forma de las colonias y la forma celular y su motilidad. Como control positivo se utilizaron *Campylobacter coli* ATCC 33559 y *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Después de que se confirmó el crecimiento en agar mCCDA, las muestras se incubaron en agar sangre (5%) en condiciones normales durante 24 h-48 h a 42 ° C, una vez que se confirmó el crecimiento en estas condiciones, las muestras se analizaron para la hidrólisis de oxidasa, catalasa e hipurato, esta última diferencia a *Campylobacter jejuni* de otras especies de *Campylobacter*. Para evaluar la sensibilidad a los antibióticos, se preparó una dilución McFarland 0.5 y se inoculó en agar Müller Hinton Sangre (5%) con 3 antibióticos sensibles (Azitromicina (15µ), Eritromicina (15µ) y Ciprofloxacina (5µ)) en condiciones microaerófilas durante 24-48 h. Las muestras se analizaron por PCR utilizando el primer 16S para el género y los primers GlyA y lipO para las especies (*Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*, respectivamente). En las PCR de detección del gen de resistencia se utilizaron los primers *ermB* y *gyrA*, en el último caso se usó una enzima de restricción (RsaI) para detectar la mutación puntual Thr86Ile. Los resultados obtenidos muestran una prevalencia del 97,5% (117/120) de *Campylobacter spp.* en Mercados evaluados (90% San Martín de Porres (27/30), 100% Santa Anita (20/20) y 100% Independencia (70/70)). La prueba bioquímica indicó que ninguna muestra fue positiva para *Campylobacter jejuni*. Las cepas fueron confirmadas como *Campylobacter coli* mediante el PCR por especie. Todas las cepas fueron resistentes a los antibióticos utilizados en la prueba de sensibilidad. La PCR para detección del gen *ermB* indicó un 53% de muestras positivas como portadoras de este gen. Mientras la PCR para detectar la mutación en el gen *gyrA* indicó que 12 de 30 muestras tenían mutación puntual Thr86Ile en su gen *gyrA*.

Palabras clave: *Campylobacter*, piel de pollo, resistencia antibiótica, PCR, genes de resistencia

## ABSTRACT

---

The present study has as objective the detection of antibiotic resistance genes *GyrA* and *ermB* in *Campylobacter spp.* Strains isolated from chicken skin commercialized in Lima Metropolitana Markets. In order to proceed 120 chicken's skins of Lima Metropolitana municipal markets were sampled (Santa Anita (20), San Martin de Porres (30) and Independencia (70)). Samples went under a 24h pre-enrichment process in Preston broth at 42°C in microaerophilic environment. A 100 µl sub sample was incubated in mCCDA agar for 48h under the same conditions, once growth was confirmed colonies were evaluated for colonies form and cellular form and motility. As positive control *Campylobacter coli* ATCC 33559 and *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 were used. After growth in mCCDA agar were confirmed, samples were incubated in Blood agar (5%) under normal condition for 24h-48h at 42°C, once growth at this conditions were confirmed samples were tested for Oxidase, Catalase and Hippurate hydrolysis, this one to differ between *Campylobacter jejuni* and other *Campylobacter* species. To evaluate antibiotic sensibility, a McFarland 0.5 dilution were prepared and inoculated in Muller Hinton Blood agar (5%) with 3 antibiotic sensidisc (Azithromycin (15µ), Erythromycin (15µ) and Ciprofloxacin (5µ)) under microaerophilic conditions for 24-48h. Samples were tested by PCR using *gen* 16S primer for genus and primers GlyA and lipO for species (*Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* respectively). Resistance gen detection PCR used *ermB* gen primer and *gyrA* gen primer, in the last case a restriction enzyme (RsaI) was used to detect punctual mutation Thr86Ile. Results obtained shows a 97.5% (117/120) prevalence of *Campylobacter spp.* in evaluated Markets (90% San Martin de Porres (27/30), 100% Santa Anita (20/20) and 100% Independencia (70/70)). Biochemical test indicated that no sample were positive for *Campylobacter jejuni*. Strains were confirmed as *Campylobacter coli* by species PCR. All the strains were resistant to the antibiotic used in Sensibility test. *ErmB* gen PCR indicated 53% positives samples carrying this gene, and *gyrA* mutation PCR indicated that 12 of 30 samples had Thr86Ile punctual mutation in their *gyrA* gene

Key Word: *Campylobacter*, chicken skin, antibiotic resistance, PCR, *ermB*, *gyrA* mutation Thr86Ile.

## LISTA DE CUADROS

---

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1 Primers utilizado en el estudio .....   | 58 |
| Cuadro 2. Aislamientos de <i>Campylobacter spp.</i> en Mercados de Lima Metropolitana<br>..... | 59 |

# LISTA DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Caldo Preston posterior al Pre-Enriquecimiento .....   | 67 |
| Figura 2. Tinción Gram de Cepas de <i>Campylobacter spp.</i> .....   | 68 |
| Figura 3. Prueba de Kirby-Bauer de sensibilidad antibiótica (Agar Muller-Hinton Sangre al 5%) con discos de azitromicina (15 µg), eritromicina (15 µg) y ciprofloxacina (5 µg) .....   | 69 |
| Figura 4. Cepas Resistentes a Macrólidos y Fluoroquinolonas .....  | 70 |
| Figura 5. Producto de PCR gen <i>ermB</i> (421 pb). Muestras positivas de los Mercados de San Martín de Porres (C) e Independencia (I) .....   | 70 |
| Figura 6. Detección del gen <i>ermB</i> en cepas de <i>Campylobacter coli</i> .....  | 71 |
| Figura 7. Producto de PCR gen <i>gyrA</i> al cual se le aplicó la enzima de restricción. Muestras de los Mercados de San Martín de Porres (C) e Independencia (I). Cepas control: <i>Campylobacter coli</i> (CC) y <i>Campylobacter jejuni</i> (CJ)..... | 71 |

# 1 INTRODUCCIÓN

---

El uso excesivo de antibióticos por parte del hombre ha llevado a que en la actualidad la resistencia antibiótica en bacterias, principalmente patógenas para el hombre, sea cada vez más frecuente. La resistencia antibiótica es de vital importancia en la salud pública por el costo económico y social que este genera en un país o una región, así como en la producción animal. Estos dos aspectos se interrelacionan cuando el uso indiscriminado de antibióticos en la producción animal puede poner en riesgo la salud pública; por medio enfermedades originadas por patógenos resistentes a los antibióticos para los cuales el tratamiento es costoso, complicado y no siempre exitoso.

Las especies del género *Campylobacter* poseen una alta capacidad de adaptación a su entorno y hospederos, así como una elevada variabilidad genética. Desde la creación de este género en 1963 múltiples patógenos importantes en la salud humana y animal empezaron a ser incorporados. El género *Campylobacter* es causante de varias enfermedades en el hombre, principalmente trastornos gastrointestinales denominada campylobacteriosis mas también es capaz de originar enfermedades sistémicas, en órganos ajenos al tracto digestivo y autoinmunes (Síndromes de Guillan Barre y Miller Fisher).

Debido a su gran capacidad de adaptación *Campylobacter* posee múltiples reservorios naturales tanto animales como fuentes de agua, más su reservorio principal son las aves y en relación con la salud publica la fuente principal de campylobacteriosis humana es la carne de ave contaminada, producto de la avicultura y un proceso de sacrificio incorrecto. La capacidad de *Campylobacter*

de adaptarse y desarrollar u obtener genes de resistencia es elevada y progresiva, se documentan cepas provenientes de aves de consumo resistentes a diferentes familias de antibióticos.

Varios estudios en diferentes partes del mundo enfocados al desarrollo de resistencia antibiótica en las especies más importantes de este género obtienen y alarmantes resultados, la mayoría de ellos relacionándolos directa o indirectamente con el uso de antibióticos en la avicultura y sobre todo muchos estudios enfocados a la adaptación que este patógeno ha desarrollado para adaptarse a los diferentes componentes de la cadena productiva de la industria avícola, pudiendo aprovechar sus diferentes características para prevalecer a lo largo de esta.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 CAMPYLOBACTER

#### 2.1.1 El Genero Campylobacter

El género consta de 31 especies y 10 subespecies a la fecha. Están agrupadas taxonómicamente dentro del género *Campylobacter*, familia *Campylobacteraceae*, orden *Campylobacterales*, clase *Epsilonproteobacteria* y al phylum *Proteobacteria*. En la actualidad la enfermedad que ocasiona, la campylobacteriosis, es de gran importancia para el hombre. Sin embargo, este no fue siempre el caso, por más de 40 años se consideró que la importancia de esta enfermedad solo aplicaba a la Medicina Veterinaria (Garcia-Sanchez et al., 2018).

La historia de este género empieza en 1886, cuando Theodor Escherich describe una extraña bacteria espiralada, la cual no era posible de ser cultivada y había sido obtenida de muestras de diarrea de niños enfermos. Años después del hallazgo en muestras humanas, los médicos veterinarios cirujanos McFadyean y Stockman encontraron entre los años 1909 y 1913 una bacteria desconocida en los fetos abortados de unas ovejas (Butzler, 2018; Whitehouse et al., 2018).



Esta bacteria que se asemejaba a un *Vibrio* sería nuevamente aislada en Estados Unidos en 1919 en muestras provenientes de abortos infecciosos bovinos por Theobald Smith, quien reconocería su semejanza con la bacteria descrita anteriormente, en 1913, por McFadyen y Stockman; por lo cual y debido a la semejanza de su origen propuso el nombre de “*Vibrio Fetus*”. En 1931 Jones, Orcut y Little atribuyeron la disentería invernal presente en los porcinos que ellos observaban a la infección con un “*Vibrio*”, al cual llamaron “*Vibrio jejuni*” (Butzler, 2018).

Su relación con el hombre, aparte del descubrimiento de Theodor Escherich, empezaría años después, siendo aislado por primera vez en humanos en muestras de sangre de mujeres que sufrieron abortos. Sin embargo, su primera relación directa como causante de enfermedad en humanos sería en un brote adjudicado a la leche no pasteurizada en 357 prisioneros, en Estados Unidos en 1938 (Garcia-Sanchez et al., Whitehouse et al., 2018).

Para 1944, el “*Vibrio coli*” había sido aislado e identificado por primera vez en muestras de cerdos con disentería por Doyle (Whitehouse et al., 2018). Y en el año 1946 Levy reportó organismos similares al “*Vibrio jejuni*”, descrito años anteriores, en la sangre de los pacientes de un brote de diarrea aguda causada por ingesta de leche (Butzler, 2018). El género *Campylobacter* sería establecido en 1963 por Sebald y Véron debido a las diferencias en su composición de ADN, requerimiento de cultivo y demás; prosiguiendo el renombramiento de *Vibrio fetus* a *Campylobacter fetus*, dando lugar a la primera especie de este género (Butzler, 2018; Garcia-Sanchez et al., 2018; Whitehouse et al., 2018). Y no sería hasta inicios de 1970 que fue reconocido como un patógeno para la salud humana (Garcia-Sanchez et al., 2018).

Las especies de *Campylobacter* relacionadas directamente con el tracto digestivo de las aves y la avicultura son *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter lari*. Entre las especies existentes de *Campylobacter spp.* al menos doce están relacionadas con enfermedad en el hombre, entre las cuales *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni* son las principales. Siendo *Campylobacter jejuni* considerada la especie dominante en su relación con la salud humana (Sibanda et al., 2018).

### **2.1.2 Características del Genoma de *Campylobacter* spp**

Aproximadamente el 94.3% del genoma de *Campylobacter jejuni* codifica proteínas, además de ser el genoma de menor tamaño (1641841 bp con una proporción de G/C alrededor del 32%). Su genoma central (compartido por las todas las especies) consta de entre 866 y 1350 genes mientras que sus genes accesorios llegarían a ser entre 2500 y 4000 (parcialmente compartidos o específicos para cada cepa o grupo). La función de su genoma central sería las funciones vitales y metabólicas de la bacteria mientras que su genoma accesorio estaría compuesto por plásmidos, elementos integrados, regiones hipervariables y genes variables pareados o únicos (Garcia-Sanchez et al., 2018).

*Campylobacter* a diferencia de otras bacterias no posee la enzima ADN topoisomerasa IV, especializada en la segregación cromosómica, y posee solamente la ADN girasa (Topoisomerasa II), esencial para la replicación del ADN (Changkmanyeun et al., 2016). Se conoce por medio de análisis genéticos que *Campylobacter jejuni* carece de genes de respuesta al stress oxidativo, los cuales están presentes en muchas bacterias patógenas comunes, como los genes *rpoS*, *soxRS*, *oxyR*, *rpoH* y *cspA* (Yahara et al., 2017).

Además, se considera que, debido a su incapacidad de replicarse fuera del hospedero, las especies de este género sobreviven pasando a su fase estacionaria y sobreviviente a diferentes tipos de estrés. En las diferentes bacterias patógenas el cambio a la fase estacionaria además de indicar una drástica disminución de la tasa de crecimiento celular indica una regulación por medio del gen *rpoS*, por lo que en *Campylobacter* el mecanismo por el cual esto sucede no sería comprendido en su totalidad, pues este género bacteriano posee diversos mecanismos para sobrevivencia a situación de estrés ambiental. (Turanova et al., 2017).

Se estima que el género *Campylobacter* spp., ya sea por carecer de un sistema de reparación de desajustes o errores en su ADN polimerasa, es propenso a “variar de fase” (Esson et al., 2016). Este concepto indica que en porciones homopolinucleótidas de su genoma suceden mutaciones con una alta frecuencia resultando en una activación o desactivación de genes de la bacteria (Esson et al., 2016; Crofts et al., 2018). Las cepas de este género pueden poseer entre 12 a 29 porciones capaces de variar de fase, además de poseer regiones más susceptibles que otras a estos cambios, denominadas regiones de fase variable; en *Campylobacter* spp. se han identificado estas regiones en los loci de

capsula, glucosilación de flagelina, LOS y múltiples loci de función desconocida (Esson et al., 2016).

Este proceso, variación de fase, provee a la bacteria con una amplia gama de fenotipos que le permiten una mejor adaptación al hospedero (Sheppard y Maiden, 2015). Y le otorga una alta variabilidad a la población seleccionada lo que les permitiría evadir la respuesta inmune y aumentar su tasa de sobrevivencia en diferentes condiciones ambientales a comparación de las variantes menos adecuadas (Esson et al., 2016; Crofts et al., 2018).

Estas características genéticas mencionadas, sumadas a la transferencia genética lateral están relacionadas a la diversidad genética presente en algunos de sus componentes estructurales y antigénicos; como la capsula, el LPS, el sistema de regulación del hierro y la variada capacidad de supervivencia entre cepas de este género bacteriano (Garcia-Sanchez et al., 2018). Estas características genéticas son tanto heredables como reversibles, tienen una ocurrencia mayor que la de una mutación espontánea, siendo de  $1 \times 10^{-3}$  a  $4 \times 10^{-4}$  mutaciones/división. (Esson et al., 2016; Sheppard y Maiden, 2015).

### **2.1.3 Evolución de *Campylobacter***

La evolución de *Campylobacter spp.* hacia el organismo de nuestra actualidad según Sheppard y Maiden (2015), podría empezar con la separación entre *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* y las demás especies de *Campylobacter* de su ancestro original hace aproximadamente 6500 años, así como la formación de los clados de *Campylobacter coli* hace unos 1000 o 1700 años respectivamente, siendo la formación de complejos clonales un fenómeno aún más reciente para esta especie.

Hasta la fecha la información que se tiene es escasa (mayormente obtenida de enfermedades humanas, productos alimenticios o la agricultura), mucha de esta estando todavía oculta en cepas de los animales salvajes. La razón de esto es la capacidad de este género bacteriano para ocupar una amplia variedad de nichos, principalmente el tracto gastrointestinal de varios animales ya sea como comensal o como patógeno. Explicando el porqué del descubrimiento de nuevos genotipos al analizar las poblaciones de *Campylobacter spp.* en las diferentes especies de animales salvajes, en su mayoría de aves.

Al igual que con muchas bacterias patógenas, las cepas de *Campylobacter* fueron agrupadas en “tipos”. Esta agrupación por tipos permitió observar la compleja estructura poblacional de este género bacteriano, originado por los factores evolutivos a los cuales estuvo sometido a través del tiempo. La capacidad adaptativa de *Campylobacter* se ha relacionado no solo a la selección natural de ciertos polimorfismos genéticos sino también a la expresión de genes. Se toman de ejemplo estudios donde cepas de *Campylobacter* que son pasadas a través de un huésped animal muestran incremento tanto en los índices de colonización como en la expresión de virulencia.

Este aumento es asociado a un mecanismo de adaptación relacionado con mecanismos optimizados de interacción patógeno-hospedero de *Campylobacter*, tales como movilidad flagelar y un mecanismo que permite la reorganización a gran escala de su genoma bacteriano, conocido como “variación de fase” (Sheppard y Maiden, 2015). A través de su evolución, el genoma de *Campylobacter spp.* ha cambiado por medio de la movilización de elementos de su genoma, la integración de ADN por transformación natural y los cambios en sus mencionadas zonas hipervariables; todo lo cual contribuiría a su gran heterogeneidad genética y fenotípica (Garcia-Sanchez et al., 2018).

Se podría tomar por ejemplo la identificación de una región de 7 genes asociada con la biosíntesis de vitamina B5 casi universalmente presente en cepas proveniente de reses y frecuentemente ausente en pollos y aves salvajes. Estos procesos de adaptación basados en su hospedero explican él porque es cada vez más frecuente encontrar linajes de *Campylobacter jejuni* pertenecientes a un grupo genético asociado a una especie de hospedero (mayormente aves salvajes) (Sheppard y Maiden, 2015). Por otra parte, se han encontrados semejanzas por medio de técnicas de tipificación molecular entre cepas de *Campylobacter spp* a pesar de estar ampliamente separadas geográficas (Garcia-Sanchez et al., 2018). Esto se relacionará con el hallazgo de grupos genéticos, donde se observan más semejanzas entre cepas provenientes de una misma especie u hospedero de diferentes continentes que entre cepas aisladas en la misma localidad, pero en diferentes especies (Sheppard y Maiden, 2015).

Sin embargo, en lo que respecta a los animales de granja se pueden encontrar múltiples grupos clonales en un mismo animal, indicando que ninguno de esos múltiples grupos clonales ha evolucionado lo suficiente para poder excluir a los demás grupos. Esto debido a la reciente domesticación de estos animales e interacción de los mismo con

*Campylobacter* en comparación con los animales salvajes. Aun así, al igual que con los animales salvajes, se encuentran más semejanzas entre cepas de *Campylobacter* de una misma especie doméstica independientemente de la localización que entre cepas de diferentes especies domésticas. Se podría inferir que a largo plazo existirían linajes de *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni* pertenecientes a grupos genéticos fuertemente asociados a las diferentes especies de animales doméstico (Sheppard y Maiden, 2015).

#### **2.1.4 Cultivo y detección**

Las especies de *Campylobacter spp.* son bacterias gran-negativas, no formadoras de esporas, con una medida aproximada entre 0.2 a 0.8 por 0.5 a 5 micras, pueden presentar forma de bastón, espiral, curvadas o esféricas. La mayoría de las especies de *Campylobacter spp.* poseen un único flagelo a uno o ambos polos celulares, existiendo una especie que carece de flagelos y es no móvil (*Campylobacter gracilis*) y una especie multiflagelada (*Campylobacter showae*) (Bolton, 2015; Sibanda et al., 2018).

Son oxidasas positivas (excepto *Campylobacter gracilis*) e indol negativo, quimioorganotrofos cuya fuente de energía son aminoácidos o productos intermedios del ciclo de ácido tricarboxílico. Reducen fumarato a succinato, no poseen lectinasas o actividad de lipasas y no hidrolizan gelatina ni caseína (García-Sánchez et al., 2018). La mayoría de las especies de *Campylobacter* crecen bajo condiciones de micro aerobiosis y tienen un metabolismo respiratorio; sin embargo, algunas especies (*Campylobacter concisus*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter mucosalis*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* y hasta cierto punto *Campylobacter hyointestinalis*) requieren hidrogeno como un donador de electrones para el crecimiento en micro aerobiosis (Butzler, 2018).

Las especies termo tolerantes como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter upsaliensis* poseen una temperatura de crecimiento óptimo de 42.5°C, mientras que las demás prefieren temperaturas de 37°C (García-Sánchez et al., 2018; Sibanda et al., 2018). Las colonias de cepas de *Campylobacter spp.* donde predominan la morfología helicoidal son pequeñas redondas y brillantes, mientras que al aumentar el número de células con forma bacilar se van aplanando, tornando de tonalidad opaca y aplanando, así como aumentando su radio (Esson et al., 2016).

Desde su descubrimiento y por muchos años *Campylobacter spp.* fue considerado un patógeno de cultivo complicado, siendo en su inicio catalogado como no cultivable. Elisabeth King, convencida de la relación de que la relación entre este nuevo patógeno y los casos de enfermedad humana estaba siendo subestimada, desarrollo una técnica de filtración especial que permitió a Butzler en los 70s aislar al patógeno de muestras de diarrea humana. Pero no sería hasta la creación del suplemento selectivo compuesto por vancomicina, polimixina B y trimetropim que se lograría su cultivo de manera óptima (Garcia-Sanchez et al., 2018).

Entre las razones que convierten a *Campylobacter* en un patógeno de difícil cultivo, sobre todo en muestras frescas, están su mala tolerancia al estrés ambiental, la existencia de otras bacterias competidoras, necesidad del uso de sangre para aliviar el estrés oxidativo y presentar en la mayoría de los casos un número muy pequeño de células cultivables (Debruyne et al., 2008). Resultando en casos de falsos negativos por contaminación con otras bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomona spp.*, etc.

Su principal contaminante es la *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido en medios basados en la cefoperazona como el medio Bolton, mCCDA o Campyagar. Mientras que en los agares mencionados el número de bacterias no *Campylobacter* que pueden crecer es amplio, este número se reduce drásticamente en el medio Preston, relacionado posiblemente con los antibióticos que lo componen (Yoo et al., 2014). Los protocolos o matrices para el aislamiento varían según los años y las necesidades de la población, pero comparten el uso de ciertos factores como un barredor de oxígeno (sangre) para aliviar el estrés oxidativo y en la mayoría de los casos un pre-enriquecimiento. (Silva et al., 2011).

Basándonos en las normas ISO se tuvo de referencia como medio de pre-enriquecimiento el medio Bolton hasta el 2017, donde fue cambiado por el caldo Preston. De la misma manera en que los medios de pre-enriquecimiento cambiaron, las temperaturas y pruebas de control positivo también lo hicieron. Entre los componentes que no variación entre los ISO del 2006 y el 2017 es el uso del agar mCCDA como medio selectivo por su capacidad de permitir el aislamiento de un mayor número de cepas.

La identificación en laboratorio por medio de pruebas bioquímicas es tediosa y complicada por ser “bioquímicamente inerte” y sus exigentes requerimiento de cultivo,

siendo la prueba de hipurato una de las pocas consideradas como estándar en su identificación, para poder diferenciar a *Campylobacter jejuni* de otras especies, principalmente *Campylobacter coli* (Garcia-Fernandez et al., 2018). Siendo posible que en algunas ocasiones esta prueba de resultados difícil de interpretar. (Persson y Olsen, 2005). Si bien se han probado diferentes pruebas bioquímicas o Kits comerciales para la detección de especies diferentes a las 2 previamente mencionadas, por lo general no presentan resultados constantes o tienden a variar entre cepas de la misma especie; siendo por lo tanto resultados en algunos casos bastante ambiguos.

En los 60s, la hibridación ADN-ADN a nivel del genoma completo era considerada el estándar de oro para la delineación de especies bacterianas, así como sucedió como *Campylobacter*. En los 80s se utilizó la prueba de semejanza genética ribosomal para la revisión y clasificación bacteriana. Sobre esto se construyó en los 90s la evaluación a grado de semejanza de los ARNr del 16S tanto para estudios taxonómicos moleculares como para el diagnóstico molecular, el cual es uno de los métodos más comunes para la identificación de microorganismos (Whitehouse et al., 2018). Desde entonces, y a la fecha se han desarrollado técnicas moleculares de alto poder discriminatorio para el estudio epidemiológico y monitoreo de *Campylobacter spp.* tanto en humanos como en animales, que permiten evaluar la semejanza genética entre diferentes cepas de *Campylobacter spp.* e identificar y monitorear la presencia de genes de resistencia antimicrobiana, originados por mutación o modificación del ADN o ARN bacteriano (El-Adawy et al., 2012; Pergola et al., 2017).

La técnica de identificación de *Campylobacter* mediante PCR se caracteriza por su rapidez, especificidad y sensibilidad. Permitiendo reemplazar o complementar el uso de la detección microbiológica por medio de aislamientos bacterianos (Persson y Olsen, 2005). Además de apoyar en la identificación por especie de cepas de *Campylobacter* caracterizadas por su limitada actividad bioquímica. Por esta razón se desarrollaron diferentes ensayos de PCR a través de los años, tanto simples como múltiples, para las diferentes especies de *Campylobacter spp.* permitiendo identificar con rapidez no solamente a *Campylobacter coli* y/o *Campylobacter jejuni* (Debruyne et al., 2008). Los genes utilizados varían entre las diferentes técnicas según el autor y el objetivo del estudio, pudiéndose usar una amplia variedad de genes: *asp*, *hipO*, *ceuE*, *cadF*, *ARN 16s*, *glyA* (Persson y Olsen, 2005).

Las técnicas moleculares de detecciones son utilizadas no solo para la identificación del patógeno en muestras humanas, animales o ambientales sino también para la asociación de los brotes de enfermedad en el hombre a una fuente u origen, o la detección de diferentes genes o mutación asociados a la resistencia antimicrobiana (Whitehouse et al., 2018).

### **2.1.5 Estructura antigénica de *Campylobacter* spp.**

*Campylobacter* al ser una bacteria gran negativa, posee una pared celular compuesta por dos bicapas lipídicas, la membrana externa (ME) y la membrana interna (MI) las cuales están separadas por el espacio periplasmático (EP) el cual contiene peptidoglicano (Wallat, 2015).

La cara externa de la ME está compuesta por lipopolisacáridos (LPS) y la cara interna por fosfolípidos. La composición de los lipopolisacáridos es polimórfica y varía entre cepas. El gran potencial electrostático del núcleo externo bloquea la penetración de la membrana por parte de moléculas hidrofóbicas, por otra parte, la ME en si es hidrofóbica e impide que sustancias hidrofílicas se unan a la bacteria. La capa interna de péptido glucano es una mezcla de azúcares y aminoácidos entre enlazados, cumpliendo la función de regular la presión osmótica mientras que estabilizan ambas capas de la ME. Los fosfolípidos que componen la ME y la MI son principalmente; fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilglicerol (FG) y cardiolipin (CL) (Wallat, 2015).

Entre las estructuras a base de carbohidratos están los LPS, la capsula, los glucanos de superficie (O- y N-uniones). Los lipopolisacáridos se dividen en lípido A, los núcleos interno y externo y el Antígeno O (Bolton, 2015).

Los genes que codifican los componentes de su LPS y capsula son altamente variados entre las cepas de *Campylobacter* spp., dividiendo los genes que codifican la cápsula en 11 y los que codifican el LPS en 18. Esta diferencia y variación se relaciona con estrategias de las cepas para evadir la respuesta inmune del hospedero (García-Sánchez et al., 2018). Es importante resaltar que la semejanza que existe entre los Antígenos O sialilados, perteneciente al Locus clase A, B y C, de algunas cepas de *Campylobacter* spp. con el componente oligosacárido de los gangliósidos (glucolípidos con cabezas polares muy grandes formadas por unidades de polisacáridos cargadas negativamente), los cuales son lípidos que se encuentran en la membrana de las neuronas,



es la razón de la aparición de los desórdenes neurológicos de Guillain-Barré y Miller-Fisher (Wallat, 2015).

La superficie de *Campylobacter spp.* está cubierta por una capsula de polisacáridos que protege de la desecación, facilita la adhesión, evasión de la respuesta inmune del hospedero y la formación de biofilms (Bolton, 2015).

El saco de peptidoglicano es una capa semejante a una malla que se encuentra rodeando la membrana interna, brindándole firmeza y rigidez a la pared bacteriana. Se compone de cadenas intercaladas de residuos de N-acetylglucosamina con uniones  $\beta$ 1-4 (GlcNAc) y de ácido N-acetyl murámico (MurNac) que están conectados mediante péptidos cortos unidos al MurNac residual (Firdlch et al., 2019).

*Campylobacter spp.* posee un sistema de N-glucosilación codificado por el locus multigen *pgl* responsable de la modificación post-translación de más de 60 proteínas periplasmáticas (incluida la flagelina y uniones de membrana) mientras que el sistema de O-glucosilación solo modifica subunidades de flagelina. El sistema “N” facilita la evasión del sistema inmune por la dominancia inmune de las mitades de glicosil, que conlleva a una producción de anticuerpos reducida; se estima que el sistema “N” protege a *Campylobacter jejuni* de las proteínas intestinales (Bolton, 2015).

Las proteínas son parte tanto de la ME, MI y el EP, entre las funciones que cumplen se encuentran la biogénesis de membrana, translocación y ensamblaje de proteínas, captación de nutrientes y expulsión de drogas. Las proteínas en la MI son normalmente alfa-helicoidal, mientras que las encontradas en la ME forman b-barriles, las proteínas de transmembrana son la expresión a esta regla (Wallat, 2015).

Los flagelos están compuestos por cuerpo o base, un gancho-basal y los componentes del filamento extracelular. El cuerpo está constituido por una base incrustada en el citoplasma y la membrana interna celular y una barra Inter plasmática con estructuras de anillo (Garcia-Sanchez et al., 2018). El complejo de estas estructuras está formado por múltiples proteínas: FliF (forma el anillo que une la barra Inter plasmática con la base intracelular); FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ y FliR (Sistema de secreción tipo 3); FliG, FliM, FliN y FliY (Componentes del anillo C, con FliM y FliY como proteínas de cambio del motor flagelar); MotA y motB (Componentes del motor). El gancho extracelular este compuesto por FlgE y FliK y el filamento extracelular está

compuesto de multímeros de la proteína flagelina, incluyendo la flagelina mayor, FlaA y la flagelina menor, FlaB (Bolton, 2015).

Las porinas presentan en la ME son asociaciones proteínicas trimericas de b-barriles, que permiten el ingreso de nutrientes a la célula (específicos y no específicos según la porina). La mayoría de las porinas están formadas por 16 – 18 b-hebras, ensambladas en orientación antiparalela. Los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran en el exterior del barril y estabilizan el barril dentro de su entorno lipídico por medio de fuerzas de Van-Der-Waals (Wallat, 2015). Particularmente un anillo de aminoácidos aromáticos ubicados en las interfaces extracelulares y periplasmáticas conocidos como las fajas aromáticas son quienes soportan la integridad del barril en la interfaz lipídica (Wallat, 2015).

Con relación a las porinas, en 1983 fue descrita por primera vez la expresión de una porina mayor en la ME de *Campylobacter spp.* que poseía un peso de 43 – 45 Kda. Esta porina se presentaba altamente conservada en diferentes cepas de *Campylobacter spp.*, situación que contrasta con el LPS de *Campylobacter spp.* que es altamente variable con fenotipos de antígeno O rugosos y lisos (Wallat, 2015).

La adquisición de hierro es esencial para que muchos microorganismos logren la colonización e invasión del hospedero. esto se debe a la función que cumple el hierro en el metabolismo bacteriano. Para lo cual existen los sideróforos, los cuales son producidos y secretados por las bacterias para por medio de su alta afinidad con el  $\text{Fe}^{3+}$  y la vitamina B12 para su posterior captación por medio de compuestos quelantes del hierro (Wallat, 2015; Garcia-Sanchez et al., 2018). Estas estructuras corresponden a un grupo de proteínas B-barril de 22 hebras monoméricas similares a las porinas, cuya expresión de estas de proteínas es regulada por el regulador de captación de hierro el cual es un represor de su transcripción (Wallat, 2015).

A pesar de su gran importancia, *Campylobacter spp.* no posee la capacidad de sintetizar sideróforos por su propia cuenta, pero posee un sistema de recepción que le permite usar los sideróforos de especies competidoras, pudiendo así aprovechar de mejor manera el gran número de genes que posee para su ingreso, regulación y homeostasis dentro de su genoma. Entre los sistemas de recepción de hierro que se le adjudican; el sistema de enterochelina, mediado por la proteína receptor de membrana externa CfrA y

el sistema transportador ABC de membrana interna dependiente de la unión a proteínas. Además, *Campylobacter jejuni* posee la capacidad de usar los compuestos hemo del hospedero para crecimiento, el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) se difunde a través de la membrana externa y requiere de proteínas de transporte solo en su paso a través del citoplasma, mediado por el producto del gen *feoB* (Garcia-Sanchez et al., 2018).

La capacidad de *Campylobacter* para sobrevivir al estrés oxidativo, la falta de nutrientes y ambiente esta mediada por diferentes factores, algunos inherentes a la propia cepa y especie y otros relacionados directamente con su entorno, como: luz, temperatura, disponibilidad de nutrientes y niveles de oxígeno (Garcia-Sanchez et al., 2018).

*Campylobacter* posee un sistema regulado por señales moleculares para responder al stress metabólico, este se activa en casos de escases de aminoácidos y genera el uso de recursos para la producción de aminoácidos a cambio del crecimiento y división celular. A diferencia de la mayoría de las bacterias las cuales poseen múltiples tipos de catalasas para la conversión del peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno durante el stress oxidativo, *Campylobacter* solo posee una, KatA (Bolton, 2015).

La carencia de *Campylobacter* de algunos de los genes esenciales para responder al estrés indican que este posee otros mecanismos de supervivencia que le permiten responder al stress ambiental, así como promover la proliferación de cepas capaces de crecer fuera de su hospedero específico (Yahara et al., 2017). Como es el caso del anión superóxido, para el cual *Campylobacter* posee solamente un tipo de proteína superóxido dismutasa (SodB), la cual no es regulada por la presencia del anión superóxido; en cambio posee una producción constante manteniendo un nivel basal en la célula (Bolton, 2015). O el gen *nuoK*, cuya variación codifica una subunidad de la oxidoreductasa Nuo flavodoxin: quinona relacionada con la transferencia de electrones para ahorro de energía e importante para la supervivencia al stress oxidativo (Yahara et al., 2017).

Para la supervivencia a su entorno *Campylobacter* es capaz de formar biofilms tanto “*in vitro*” como en superficies de procesado de la cadena avícola hechas de plástico, acero y/o vidrio, donde las resistencias a antibióticos, detergentes y desinfectantes esta potenciada. Los genes que intervienen en la formación son genes relacionados con motilidad, modificaciones de superficie, respuesta al stress (Garcia-Sanchez et al., 2018).

En resumen, se entendería que solo aquellas células capaces de adaptarse de una manera óptima al estrés oxidativo podrían sobrevivir y por lo tanto replicarse (Bolton, 2015).

#### **2.1.6 Variación morfológica**

Las bacterias poseen diferentes formas, están son generalmente conservadas para cada especie y esta información se almacena en su genoma, para así por medio de múltiples mecanismos asegurar que la forma de la bacteria se mantenga durante el crecimiento y la división. Esto es debido a que la forma de la bacteria le brinda características para su entorno y su propio metabolismo. Sin embargo, durante su ciclo de vida algunas son capaces de cambiar su forma, alternando sus propiedades biológicas (Firdlch et al., 2019).

*Campylobacter spp.* posee una forma helicoidal la cual es rara entre las especies bacterianas y se piensa que les confiere ventajas tanto en la colonización como en la patogenia. Sin embargo, estas pueden cambiar su estructura celular para tomar formas de bastón o cocoide (Esson et al., 2016) En cepas de laboratorio, así como en los pollos es común encontrar la forma bacilar de esta bacteria, esto se cree está involucrado con el cambio de fase durante su crecimiento, así como un desarrollo de plasticidad morfológica propio de cada cepa, además de brindarle una mayor probabilidad de supervivencia a largo plazo y capacidad de adaptación (Wheeler et al., 2019).

La morfológica de *Campylobacter* es helicoidal durante su fase de crecimiento exponencial, sin embargo, bajo condiciones de stress, falta de nutrientes, stress oxidativo, cambios en el pH y la osmolaridad surge un cambio en su estructura hacia la de un coco. La transformación de *Campylobacter* a un coco tiende a estar correlacionada con la conversión a un estado en el cual es viable mas no cultivable (VBNC – viable but non-culturable – por sus siglas en ingles), sin embargo, este estado también se puede presentar en *Campylobacter* de forma helicoidal (Firdlch et al., 2019).

De manera general *Campylobacter jejuni* es más susceptible que otras bacterias patógenas a cambios en la temperatura, humedad, presión hidrostática, oxidación y acides; más es capaz de sobrevivir y mantener su metabolismo durante largos periodos de tiempo a 4°C. Sin embargo, cuando adquiere la forma VPNC, es capaz de sobrevivir hasta 7 meses (Yahara et al., 2017; Sibanda et al., 2018; Firdlch et al., 2019). En la actualidad existe debate si esta transformación morfológica es una suerte de “estado de

reposo” o una forma degenerativa que toma el organismo. A esto se suma la característica singular que cada *Campylobacter* cocoide se obtiene según el medio en el cual fue cultivado y la velocidad en la cual entra al estado de VBNC y nivel degeneración, siendo los entornos con elevada temperatura los que originan una mayor degeneración en comparación con la escasez de nutrientes (Firdlch et al., 2019).

Otra de las características de este cambio de forma es el impacto negativo en sus capacidades de colonización, formación de biofilms, motilidad e inclusive la activación de la respuesta inmune del hospedero (Esson et al., 2016). Los *Campylobacter* cocoides son incapaces de estimular la respuesta inmune, presentan déficit de adhesión e invasión a células epiteliales y causan una reacción Nod1 y Nod2 reducida en comparación con la forma helicoidal. Esto, puede presentar importancia dentro del ciclo patogénico de *Campylobacter*, debido a que las cepas de campo de *Campylobacter* han mostrado la capacidad de realizar la transición a cocos dentro de las células epiteliales. Dependiendo de la cepa la velocidad de transición es variable, pudiendo encontrar a las 24 horas una gran totalidad de células cocoides o a partir de las 5 horas para adelante una población constituida mayormente por células con forma de bacilos y que perduran inclusive hasta las 48 horas (Firdlch et al., 2019).

Al igual que en las demás bacterias, el saco de peptidoglicano este encargado de mantener la forma helicoidal de *Campylobacter* (Firdlch et al., 2019) Esto se comprueba cuando al eliminar o sobre expresar las Hidrolasas de PG, Pgp1 y Pgp2, se altera el perfil de los muropetidos lo que origina una pérdida de la forma helicoidal y da una morfología abastionada (Esson et al., 2016). Ambas enzimas están involucradas en la remodelación post biosíntesis de los peptidoglicanos. Siendo Pgp1 (enzima DL-Carboxipeptidasa) encargada de hendir los tripéptidos de los peptidoglicanos a dipéptidos y Pgp2 (enzima LD-Carboxipeptidasa) los tetrapeptidos a tripéptidos (Esson et al., 2016). La pérdida de cualquiera de estas hidrolasas altera la capacidad de *Campylobacter* de sobrevivir al stress e interactuar con su huésped (Firdlch et al., 2019).

Estudios realizados al saco de peptidoglicano de los *Campylobacter* cocoides, mostraron que estos poseen un aumento en el número de dipéptidos y una reducción tanto en los tripéptidos como en los tetrapeptidos (Firdlch et al., 2019).

La mayoría de las cepas de *Campylobacter spp.* con forma bacilar presentan mutaciones en los genes *pgp1* o *pgp2* (inserciones o deleciones), la cual es difícilmente observable en cepas de forma helicoidal. Esto además se comprobó mediante la “activación” artificial de estos genes (*pgp1* y *pgp2*) en cepas de *Campylobacter jejuni* de forma bacilar, las cuales se tornaron helicoidales. Se estima que estas mutaciones no corresponden a mutaciones espontáneas sino a variaciones de fase en el genoma bacteriano y tendría una frecuencia de “helicoidal a bacilar” de  $2.1 \times 10^{-4}$  mientras que el proceso invertido tendría una frecuencia mucho menor (Esson et al., 2016).

El nivel de expresión del gen *pgp1* en cepas de campo se mantienen durante las primeras 24 a 30 horas de cultivo y aumentan a las 48 horas, correspondiendo al cambio de morfología de la población de *Campylobacter* a cocos en la placa, estos niveles disminuyen en el 3er y 4to día, pero se mantienen mayores que en el día 1. Esto se apoya en el análisis de expresión diferencial del ARNseq (Firdlch et al, 2019).

El gen *AmiA*, encargado de la síntesis de *AmiA* una amidasa N-acetylmuramonyl-L-alanina la cual corta la cadena lateral de peptidoglicanos importante para cortar el tabique entre células durante la división celular, parece tener un rol importante en el cambio de morfología. *Campylobacter* con mutación del gen *AmiA* formó cadenas largas de múltiples células hijas, además de mostrar retrasos en la inducción a la forma de coco (Firdlch et al, 2019).

Las cepas de *Campylobacter* con mutaciones o alteraciones genéticas que promueven y/o permiten la transición morfológica (a bacilo o pseudo espiral) están relacionadas con casos de campylobacteriosis extraintestinal (Wheeler et al., 2019).

#### **2.1.7 Reservorios de *Campylobacter spp.***

Las especies del género *Campylobacter* son capaces de sobrevivir en una amplia variedad de medio y organismos en las diferentes regiones del mundo. *Campylobacter spp.* tiene una alta tasa de sobrevivencia en agua, permitiéndole contaminar reservorios de agua y de esta manera el alimento de animales como pastizales. La presencia de *Campylobacter spp.* en agua en Luxemburgo se atribuyó principalmente a aves silvestres (61%), en segundo lugar, otros animales silvestres (20.2%) y muy escasamente a la avicultura (18.8%). Si bien las especies de *Campylobacter spp.* son sensibles al tratamiento con cloro, se debe tener en cuenta el tratamiento contra protozoarios, debido

a que *Tetrahymena pyriformis* actúa como reservorio de *Campylobacter jejuni* (Sibanda et al., 2018).

Las estructuras genéticas que presentan les permiten a las especies de *Campylobacter* lograr desarrollar asociaciones a hospederos específicos, tanto mamíferos como aves; en los cuales *Campylobacter* puede ser parte del microbiota intestinal (Yahara et al., 2017). El microbiota intestinal es de vital importancia en las funciones inmunes, nutricionales, metabólicas y fisiológicas del hospedero, no solo humanos sino también animal; sobre todo los animales de producción. En estos, un microbiota saludable se relaciona con mejores parámetros productivos (Ocejo et al., 2019). Siendo comprensible que diversas especies animales de producción (Bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, canes etc.) posean este microorganismo en su microbiota y sean capaces de transmitir este microorganismo, inclusive las cepas multidrogo resistentes (Karikari et al., 2017; Premaratne et al., 2017; Garcia-Sanchez et al., 2018).

## **2.2 CAMPYLOBACTER EN LA SALUD PUBLICA**

### **2.2.1 Impacto en la salud publica**

Las especies de *Campylobacter spp.* son reconocidas como la mayor causa de enfermedades bacterianas gastrointestinales transmitidas por alimentos en humanos y la tercera causa más común de mortalidad entre los principales patógenos (Jayasekara et al., 2017; Yahara et al., 2017; Garcia-Sanchez et al., 2018). En Europa, África, Asia y el Medio Oriente esta enfermedad es considerada endémica, siendo la incidencia altamente variable dentro del mismo país en los diferentes periodos de tiempo (Garcia-Sanchez et al., 2018). Esta enfermedad y el patógeno que la origina son monitoreados por diferentes organizaciones a nivel mundial; La Agencia de Salud Pública de Canadá, La FDA en Estados Unidos y la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (Mehdi et al., 2018). Se le relaciona con episodios diarreicos acompañado de malestar general y con el síndrome de Guillain-Barré, así como poseer una baja dosis infectiva en comparación a otros agentes causantes de ETAS (Hernández et al., 2013).

Si bien se reconoce a *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* como las especies más importantes en este aspecto, especies emergentes como *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter fetus* y *Campylobacter ureolyticus* también han sido asociados a la presentación de enfermedad en el hombre. La importancia de

*Campylobacter* como patógeno para el hombre se ha dado de manera progresiva a través de los años, por medio del aumento de los casos de campylobacteriosis humana, principalmente en países en desarrollo o desarrollado. El número total de casos ha logrado ascender a los 166 millones de casos por año a nivel global, siendo altamente variable entre los países (Whitehouse et al., 2018).

En el Reino Unido en el 2016, 90.8 de cada 100 000 personas sufrieron de campylobacteriosis, en Nueva Zelanda el índice fue de 158.9 por cada 100 000 personas (Wheeler et al., 2019). En la unión europea es diferente para cada país y región a través de los años, solamente de 0.6% a 13.1% en los países nórdicos a 74.2% a 80% en muchos otros países (Skarp et al., 2015). Sin embargo, en muchos países esta enfermedad no se reporta de manera obligatoria o se subestima su verdadero impacto, siendo subdetectada. Un ejemplo de esto son Estados Unidos o Canadá donde solo se diagnosticaron 14 casos por cada 100 000 personas y 23 casos por cada 100 000 personas respectivamente, más se estima que podría llegar a afectar 1.3 millones de personas por año solo en Estados Unidos (Whitehouse et al., 2018). Además de la propia campylobacteriosis como signo de alerta, *Campylobacter spp.* es capaz de originar enfermedades extraintestinales, por su capacidad y alcanzar el torrente sanguíneo. En Nueva Zelanda en el 2010, el 0.28% (167) involucraban cepas de *Campylobacter spp.* aisladas en sangre; en el Reino Unido entre 1989 y el 2011 fue del 0.17% (1 665 de 994 791) (Wheeler et al., 2019).

Existen diferentes vehículos para la transmisión y adquisición de la enfermedad en el hombre, tales como defecación de animales (de granja o silvestres), productos agropecuarios, animales domésticos o mascotas, corrientes de agua, vectores invertebrados como moscas, escarabajos etc. y, si bien muy poco reportado, sería posible la transmisión de persona a persona (Garcia-Sanchez et al., 2018). Si bien se considera a los productos avícolas de manera general como la causa principal de esta enfermedad, la característica esporádica de la enfermedad la ha asociado a diferentes productos agrícolas: Leche de vaca sin pasteurizar, queso hecho con leche sin pasteurizar, carne de res y sus vísceras, carne de cerdo y sus vísceras, carne de ovino y sus vísceras, agua, derivados lácteos varios e inclusive mascotas (Sibanda et al., 2018; Garcia-Sanchez et al., 2018).

Por otra parte, los brotes de esta enfermedad son raros y de naturaleza esporádica, dependiendo de la región o país han sido adjudicados a diferentes orígenes como: los productos lácteos (más importante en Estados Unidos), los cerdos, y en su mayoría a la



avicultura (Whitehouse et al., 2018). Sin embargo, los vehículos, factores de riesgo y métodos de transmisión de la campylobacteriosis por el hombre poseen diferencias entre las diferentes especies de *Campylobacter spp.* (Nohra et al., 2016). Siendo el consumo o interacción con carne o productos avícolas contaminados el factor de riesgo principal para la enfermedad ocasionada por *Campylobacter jejuni*, para *Campylobacter coli* el factor principal es nadar en fuentes de agua silvestres o el mar y el consumo de vísceras de aves (principalmente) u otras especies, para *Campylobacter upsaliensis* el contacto con perros o gatos y para *Campylobacter fetus*, la causa principal de bacteriemia, es consumo o contacto con vísceras o carne de ovinos (Nohra et al., 2016; Whitehouse et al., 2018).

Se estipula de esto, que el tipo de enfermedad, así como su intensidad estarían influenciados por factores genéticos propio de las cepas de cada región y/o del estilo de vida de cada país o región. (Wheeler et al., 2019). Y que además el haber padecido de la enfermedad no confiere protección frente a futuros contagios, por la variedad genética estructural que presentan las cepas (Kaakoush et al., 2015). Por medio de análisis a complejos clonales se encontró una posible selección genética en cepas de *Campylobacter*, hallándose un aumento de la predominancia de ciertos grupos clonales (entre 34% y 41%) durante la cadena de procesamiento y más intensamente en los casos de enfermedad humana, pudiéndose relacionar esta selección genética con la capacidad de causar enfermedad en el hombre por parte de *Campylobacter spp.* (Yahara et al., 2017).

Conociendo el rol de la avicultura como medio principal de transmisión de la enfermedad, adquiere mucho sentido que los métodos más eficaces para su control suelen estar relacionados con intervenciones en esta industria, como se vio en Nueva Zelanda, un país con un elevado índice de notificación de casos de campylobacteriosis humana; en donde se obtuvo una importante en el 2008 (Wheeler et al., 2019). Las aves de corral (sus productos, manejo o manipulación de los productos avícolas) son considerados responsables del 80% del total de casos de campylobacteriosis humana a nivel mundial, no solo por su consumo directo sino por el riesgo de contaminación cruzada para el consumidor con productos listo para el consumo o utensilios, mientras que las aves silvestres solamente de entre el 2.1% y el 3.5% (Bolton, 2015; Skarp et al., 2015; Sibanda et al., 2018; Garcia-Sanchez et al., 2018).

Se reconoce que los productos avícolas ofrecidos al consumidor pueden presentar *Campylobacter spp.* hasta en un 100% de las unidades ofrecidas, pudiendo haber

resultado contaminados durante el procesado y en los mismos centros de acopio, denotando la importancia del rol de estos en la contaminación y diseminación de *Campylobacter spp.* en la carne para el consumidor (Wei et al., 2016; Yahara et al., 2017; Garcia-Sanchez et al., 2018). La autoridad de sanidad alimentaria europea determino que si se adaptara un límite crítico de <1000 y <500 UFC/g de piel de cuello y pechuga para cada lote post sacrificio el riesgo para la salud publica disminuiría entre un 50% y 90% (Skarp et al., 2015). Esto lleva a la implementación del ISO 10272-2 como método de referencia para el conteo y verificación de las carcasas de aves respecto a la modificación de la regulación 2073/2005 donde ahora esta anexada que el nivel máximo de contaminación de carcasas con *Campylobacter spp.* es de 1000 UFC/g en el centro de sacrificio (Garcia-Sanchez et al., 2018).

En Perú el método principal de comercialización de la carne de pollo es el “pollo fresco” en los mercados o centros de acopio. Este tipo de venta por lo general es más aceptado por el consumidor que el pollo de supermercado envasado. A pesar de que la calidad sanitaria de este último sea mayor no tiene una apariencia “comercialmente aceptable” en comparación con el “pollo fresco” para el consumidor peruano. El sacrificio artesanal representa aproximadamente un 80% del pollo comercializado, sumado a esto el tipo de sacrificio que se realiza en estas instalaciones (mercados o centros de abasto) no suele seguir las normas de salubridad tanto para los trabajadores como para los consumidores (Deza y Mendoza, 2018). Por lo cual no es de extrañar que estudios de detección de *Campylobacter* realizados en Lima obtengan resultados elevados (Lazaro et al., 2012; Lucas et al., 2013).

Tan importante como es para la salud, la campylobacteriosis también afecta la economía de los países de manera directa (seguros de salud, medicinas, etc.) como de manera indirecta (afectando la productividad de las personas). la Campylobacteriosis es una de las enfermedades más caras en Europa y Oceanía, así como una de las principales causas de pérdidas de días hábiles por enfermedad (Skarp et al., 2015). En Estados Unidos *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni* causan 2.4 billones de casos anuales de ETAS (aproximadamente 1% de la población) con un costo económico significativo (Yahara et al., 2017). En la Unión Europea los costos de la enfermedad ascendieron a 2.4 Billones de euros en el 2011 (Garcia-Sanchez et al., 2018). Además, con más de 100 muertes por año causadas por campylobacteriosis el costo de esta enfermedad para el

servicio nacional de salud del Reino Unido asciende a un billón de euros anuales (Sibanda et al., 2018).

Aparte del costo económico directo de la enfermedad, se estima que el costo productivo no reportado o subestimado se daría por su característica de ser una enfermedad mayormente autolimitante; significando que una persona enferma incapaz de laborar no sentiría la necesidad de reportar la enfermedad ni buscaría asistencia médica a pesar de haber sido inhabilitado temporalmente por la enfermedad (Whitehouse et al., 2018).

Las diferentes investigaciones enfocadas al comportamiento de la enfermedad indicaron que la probabilidad de presentación es mayor en hombres que en mujeres. En Italia se encontró una relación entre la campylobacteriosis y el género estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ), con un 49% de los casos en hombre, 37% en mujeres y un porcentaje de paciente no identificados (Garcia-Fernandez et al., 2018). Otra característica es el rango etario para su presentación siendo los picos más comunes: niños (menores de 4 años), adultos jóvenes (20 a 40 años) y adultos mayores (mayores de 75) (Skarp et al., 2015). Asimismo, se identificó que posee cierta estacionalidad, siendo el verano la estación de mayor número de presentación de casos, representando un 45% del total de casos anuales (Garcia-Fernandez et al., 2018). De manera curiosa el viajar fue encontrado como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, siendo asociado desde un 18% hasta un 42% de los casos reportados, dependiendo del país y época (Whitehouse et al., 2018).

Esto sería posible debido a la existencia de sistemas de vigilancia, basados en análisis de laboratorios que colectan la información sobre cepas y récords de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Shigella spp.*, *Listeria spp.* y *Yersinia spp.* (Garcia-Fernandez et al., 2018). Adicionalmente, aún existe debate si la posición socioeconómica de una persona se debería considerar como un factor de riesgo para la presentación de la enfermedad, debido a los resultados contrarios de diferentes estudios algunos indicando una mayor presentación de casos mientras aumenta la educación y la capacidad económica mientras que otros relacionan la enfermedad a zonas de bajo nivel económico (Whitehouse et al., 2018).

A pesar del riesgo en la salud pública que representa este patógeno, en varios países no se le considera todavía dentro de las enfermedades bajo vigilancia (Pergola et al., 2017). En el Perú la información sobre cepas de *Campylobacter spp.* es escasa, más aun, teniendo en cuenta la relación que existe entre este microorganismo y la carne de pollo, una de las principales fuentes de ingreso y de proteína, siendo considerada como un producto de la canasta básica de consumo debido a su importancia tanto nutricional como cultural (MINAGRI, 2018).

### **2.2.2 Factores de Virulencia y Patogenia en el Hombre**

Unas cuantas células de *Campylobacter* (desde 360 UFC) provenientes de pollo crudo a mal cocinado son capaces de causar la enfermedad en el hombre, luego de su ingreso las células de *Campylobacter spp.* coloniza la parte baja del tracto gastrointestinal (colon, ciego e íleo) en algunos casos sin desarrollar sintomatología alguna (Bolton, 2015; Whitehouse et al., 2018).

A través de años de estudios, se relacionó a la capacidad de *Campylobacter* para adherirse a células epiteliales, producir citotoxinas y movilizarse, con factores genéticos los cuales fueron asociados con la presentación de la enfermedad, así como su intensidad (Wheeler et al., 2019). Además, se observó en paciente humanos voluntarios que la severidad, respuesta a la dosis del tratamiento y relación enfermedad/infección depende de la cepa causante (Whitehouse et al., 2018). Sin embargo, aún se desconoce la función de muchas de las proteínas producidas por sus genes y sobre todo cuáles son los factores que originan cepas de *Campylobacter spp.* con la predisposición genética de causar enfermedades más severas en el hombre (Garcia-Sanchez et al., 2018; Wheeler et al., 2019).

De manera inicial se debe mencionar que los mecanismos de colonización de *Campylobacter spp.* en los humanos son similares a los hallados en las aves, explicando en parte por qué un “pasaje previo” en aves aumenta la capacidad de colonización y expresión de factores de virulencia en el hombre. Mas similares no significa idénticos, pues el proceso inverso parece no funcionar para *Campylobacter spp.* en la colonización de aves (Bolton, 2015). *Campylobacter* es capaz de adherirse, invadir y sobrevivir dentro de las células epiteliales; estas características sumadas a su capacidad de producir toxinas y colonizar el epitelio intestinal son las que se usan frecuentemente para medir la

capacidad de virulencia de cepas de *Campylobacter spp.* (Bolton, 2015; Fridlch et al., 2019).

Entre las características más importantes para la colonización de *Campylobacter spp.* destacan su motilidad, su forma y su quimiotaxis. La motilidad de *Campylobacter spp.* se da mediante un sistema quimio sensor que maneja el movimiento flagelar basándose en las condiciones que su entorno le provee, todo este mecanismo consta de la participación de productos y mecanismos provenientes de más de 10 genes, los que en entornos estresantes para el patógeno se encuentra sobre regulados, siendo inclusive algunos de ellos, como el gen *flaA*, considerados como responsable de la patogenicidad de las cepas (Bolton 2015, Garcia-Sanchez et al., 2018). El flagelo de *Campylobacter spp.* posee en su estructura, componentes homólogos al de un sistema de secreción tipo II, el cual permite el transporte de proteínas flagelares y no flagelares (CiaB, CiaC, CiaI, FlaC y FspA), sirviendo de una “jeringa molecular para la patogenia bacteriana. (Garcia-Sanchez et al., 2018).

La forma helicoidal” de *Campylobacter spp.* le permite colonizar el epitelio intestinal, atravesando la capa mucosa de este, además de otorgarle una motilidad inusual, sobre todo en sustancias viscosas, lo cual sumado al flagelo polar (único o doble) le ofrecen un movimiento de rotación y propulsión celular. (Bolton, 2015). La quimiotaxis de *Campylobacter spp.* le permite sentir y moverse hacia condiciones más favorables, permitiéndole invadir a su hospedero. Se acepta que *Campylobacter spp.* invade el intestino de las aves como un comensal y usa la quimiotaxis para localizar su punto de colonización principal (las criptas cecales).

Durante este proceso los componentes principales de quimio atracción son las mucinas y glucoproteínas que componen la mucosa intestinal. Otros componentes serían los substratos metabólicos (L-aspartato, L-asparagina, L-cisteína, L-serina, L-glutamato y A-glutamato), receptores de electrones (fumarato, dimetil sulfoxido, nitrito, nitrato y peróxido de hidrogeno) y donadores de electrones (L-malato, L-lactato y succinato). Por otra parte, la bilis es un repelente muy potente de *Campylobacter spp.* (Bolton, 2015). La capacidad de colonización de *Campylobacter spp.* también puede verse afectada por las mutaciones genéticas. Las mutaciones en el gen *flaA* (encargado de codificar la proteína *flaA*), pueden reducir su capacidad para la colonización del TGI de los pollos. Mutaciones

de los genes capsulares *kspM* y *kspE* disminuyen la capacidad de la bacteria de colonizar el TGI de los pollos y de sobrevivir en el suero humano (Bolton, 2015).

La adhesión de *Campylobacter spp.* se da principalmente por la unión a la fibronectina (encontrada en las células epiteliales gastrointestinales) a la proteína de unión a la fibronectina, *cadF*, encontrada en la membrana externa; mas también intervienen otras proteínas como el autotransportador *CapA*, la proteína de unión periplasmática *PEB1* y la lipoproteína de superficie expuesta *JlpA*. Esta unión activa GTPasas *Rac1* y *Cdc42* que inducen la internalización de *Campylobacter* en la célula (Bolton, 2015). Entre los principales genes que intervienen en el proceso de adhesión celular destacan *cadH* (gen de adhesión), *racR* y *dnaJ* (Garcia-Sanchez et al., 2018).

Las proteínas *CiaD*, *CiaB*, *CiaC*, *CiaI*, *VirB11*, *VirK*, *IamA*, *CeuE*, *HtrA*, *FspA* y *PdIA* poseen diferentes roles en el proceso de invasión, más el mecanismo exacto de muchos no es aún comprendido en su totalidad. Sin embargo la existente información acerca de las proteínas del grupo *Cia* (Antígenos de Invasión de *Campylobacter*): *CiaB*, adhesión a la célula objetivo, *CiaC*, completa invasión de células INT-407, *CiaI*, supervivencia intracelular y la recientemente descubierta *CiaD*, invasión máxima de la célula hospedera; indica que son las proteínas claves para la invasión y supervivencia de *Campylobacter* en la célula hospedera y que son transportadas por el sistema de secreción tipo II flagelar de *Campylobacter spp.* (Garcia-Sanchez et al., 2018).

*Campylobacter spp.* produce un variado número de toxinas, la principal y más estudiada es la Toxina de Distensión Cito-letal, codificada por el operon *cdtABC*. Muchas bacterias Gram-negativas poseen la habilidad de sintetizar TDC, una toxina tripartita compuesta por 3 subunidades (codificadas por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*). Los productos de los genes *cdtA* y *cdtC* son 2 subunidades heterodiméricas responsables de la unión de la toxina a la membrana celular de la célula objetivo, así como del envío o transporte de la *CdtB* (producto del gen *cdtB*), el cual es la subunidad de activación enzimática (Bolton, 2015). Una vez esta proteína entra al núcleo actúa como la enzima desoxirribonucleasa, bloqueando la *CDC2* quinasa vital para la transición entre la fase G2 (periodo de rápido crecimiento) y la mitosis; esto conlleva a la fragmentación del núcleo y la distensión celular; en las células del sistema inmune luego de detener el ciclo vital de la célula causa la apoptosis, lo que relaciona su invasión con la supresión de la respuesta celular y humoral del hospedero (Bolton, 2015; Garcia-Sanchez et al., 2018).

Los LPS son los responsables de desencadenar la respuesta inmune que conlleva a las neuropatías de los Síndromes de Guillain-Barre y Miller Fisher (Bolton, 2015).

*Campylobacter* origina una respuesta inmune del tipo innata la cual resulta en la producción de citoquinas proinflamatorias, así como el linfocito quimio atrayente IL-8 (Friedl et al., 2019). Las flagelinas de *Campylobacter spp.* son diferentes estructuralmente al de otras bacterias, característica por la cual no activa la respuesta del hospedero basada en receptores tipo toll 5 (Garcia-Sanchez et al., 2018).

La evasión de la respuesta inmune comprende a múltiples estructuras. En una de ellas, el LPS (implicado también en la adhesión e invasión), su sialilación disminuye su capacidad inmunogénica y promueve su capacidad de invasión (Bolton, 2015). Las cepas de *Campylobacter* con locus de LPS clase A, B y C presentan el gen *cst-II*, el cual sintetiza sialitransferasas mono funcionales, los genes con Thr51 sintetizan solamente la sialitransferasa ( $\alpha$ 2-3) mientras que aquellos Asn51 sintetizan además  $\alpha$ 2-8. La sialitransferasa  $\alpha$ 2-3 produce los epítomos en el LPS tipo-GM1, GM2 y GD1a, y la sialitransferasa  $\alpha$ 2-8 produce los epítomos en el LPS tipo-GT1a y GD1c (Rodriguez et al., 2018).

La sialilación de los componentes de la LPS permite que *Campylobacter* induzca una respuesta de células B, Th2, además que las cepas de *Campylobacter jejuni* que presentan estructuras en su LPS relacionados con la sialitransferasa  $\alpha$ 2-3 pueden interactuar con los Siglec (sialoadhesina) (lecitina tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico) de los macrófagos, microglías, oligodendrocitos y células de Schwann (Kaakoush et al., 2015; Rodriguez et al., 2018). Se considera la inducción de la respuesta de Células B, Th2 y la presencia de los epítomos mimicry tipo-GD1a, GD1c y/o GM1a en el LPS de *Campylobacter jejuni* como los factores predisponentes para el desarrollo del síndrome de Guillain-Barre (Kaakoush et al., 2015).

La capsula implicada tanto en la adherencia, sobrevivencia y evasión de la respuesta inmune es sintetizada por genes localizados en la región hipervariable del genoma de *Campylobacter spp.* por lo cual su presencia y expresión puede ser activada y desactivada en los diferentes estadios de vida del *Campylobacter* (Bolton, 2015). Sus muro-péptidos pueden activar los receptores citoplasmáticos humanos del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (Nod). El Nod 1 reconoce tripéptidos que

contienen ácidos diaminopemélicos en bacterias Gramnegativas, mientras el Nod 2 reconoce dipéptidos tanto en bacterias Gramnegativas y Grampositivas (Friedl et al., 2019).

A la actualidad se desconoce si la capacidad de *Campylobacter spp.* de invadir el torrente sanguíneo y causar patologías extraintestinales está relacionada directamente con sectores de su genoma como sucede en *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y el grupo A de los streptococcus (Wheeler et al., 2019). Esto se debería a que los genes presentes en las cepas de *Campylobacter jejuni* asociadas a la enfermedad en el hombre varían entre los diferentes complejos clonales (Yahara et al., 2017). Como se observa en la detección de los genes capsulares *cj1421c* y *cj 1428c* relacionados con los casos de Síndrome de Guillain-Barre (Kaakoush et al., 2015).

### **2.2.3 Síntomas, Complicaciones y Tratamiento en el hombre**

La mayoría de los casos humanos originados por *Campylobacter spp.* suelen ser autolimitantes y solo requerir tratamiento sintomático (descanso y rehidratación) (Hernández et al., 2013). La presentación clínica entre *Campylobacter jejuni*, considerado la causa principal de la campylobacteriosis en el hombre, y *Campylobacter coli* es indistinguible (Whitehouse et al., 2018). Ocurre 24 a 72 horas posterior a la ingesta y sucede en respuesta a la colonización del patógeno. Mayormente se presenta como una gastroenteritis leve autolimitante con 1 a 3 días de fiebre, dolor de cabeza y vómitos, seguidos de a 5 a 7 días de dolor abdominal con diarrea acuosa o, en el 15% de los casos, sangrienta, indicando invasión y lesión al tejido del colon y el recto; en estos casos los síntomas y el dolor asemejaran una colitis ulcerativa aguda (Skarp et al., 2015; Whitehouse et al., 2018). Sin embargo, un tercio de los pacientes pueden presentar una sintomatología similar a la influenza (fiebres, escalofríos, dolor de cabeza y mialgia). El punto más fuerte de la enfermedad dura entre 24 y 48 horas, con un dolor abdominal que puede asemejarse al de una apendicitis. (Whitehouse et al., 2018).

Se ha relacionado a *Campylobacter spp.* con casos de enfermedades dentales y bucales, IBD, esófago de Barreto, enfermedades cardiovasculares, así como la posibilidad del desarrollo de una bacteriemia y/o alteraciones extraintestinales (Bolton, 2015; Whitehouse et al., 2018). Las diferentes especies de *Campylobacter spp.* han sido relacionadas con diferentes complicaciones posteriores a la campylobacteriosis, *Campylobacter jejuni* además de originar el mayor número de casos de



campylobacteriosis a nivel mundial también está relacionada con los trastornos de la función intestinal (dispepsia funcional y síndrome de intestino irritable), *Campylobacter concisus* es la cepa más asociada con la IBD y las alteraciones esofágicas, *Campylobacter rectus* y *Campylobacter gracilis* son asociadas a enfermedades orales y formación de abscesos y *Campylobacter fetus* con el desarrollo de meningitis bacteriana (Kaakoush et al., 2015).

La bacteriemia y enfermedades extraintestinales por *Campylobacter* parecen originarse de una colitis aguda, teniendo un origen intestinal y un mayor riesgo de desarrollarse al alargarse la enfermedad (Whitehouse et al., 2018; Wheeler et al., 2019). Las personas con campylobacteriosis extraintestinal además de padecer de diarrea también presentan dolor de cabeza, infección de implantes ortopédicos, complicación de enfermedades pulmonares crónicas, en un 10% de los casos el desarrollo del síndrome séptico y llegarse a originar infecciones pulmonares, abscesos cerebrales, meningitis, artritis reactiva, abortos, nacimiento de niños portadores, o enfermedades autoinmunes como los síndromes de Guillain-Barré o Miller-Fisher (Bolton, 2015; Garcia-Sanchez et al., 2018; Whitehouse et al., 2018; Wheeler et al., 2019).

La Campylobacteriosis es la enfermedad infecciosa que tiene el mayor índice de desarrollar el síndrome de Guillain-Barre (3/10 000 casos). Este síndrome es una severa neuropatía desmielinizante, caracterizada por una debilidad progresiva simétrica de las extremidades con o sin hiporreflexia pudiendo llegar a afectar el sistema respiratorio (Kaakoush et al., 2015; Skarp et al., 2015).

La Campylobacteriosis posee un riesgo entre el 3% y 13% de originar una artritis reactiva, mayor a la otros patógenos asociados con ETAS como *Salmonella*, *Yersinia* y *E. coli O157:H7*. A menos que la enfermedad sea tratada con antibióticos los pacientes expulsaran *Campylobacter* en sus heces varias semanas posteriores a su “recuperación” (hasta 69 días, 37.6 en promedio). Además, dependiendo de la severidad de la enfermedad el tratamiento con un solo antibiótico no es recomendado y la eritromicina no sería capaz de erradicar la enfermedad por si sola; y en el caso de cepas multidrogo resistentes el paciente puede morir antes de que el tratamiento empiece a surtir efecto (Whitehouse et al., 2018).

En pacientes con infecciones severas (0.03% de los casos) o sistemas inmunes no competentes se requiere la administración de antimicrobianos, dentro de los cuales los macrólidos y las quinolonas son los fármacos de elección (McCrackin et al., 2016; Garcia-Sanchez et al., 2018). Azitromicina y Eritromicina son los antibióticos de primera línea usados en casos de campylobacteriosis complicadas, ciprofloxacina y tetraciclina si bien son alternativas no son usadas en el tratamiento de niños (Garcia-Fernandez et al., 2018). Se observó en Perú que el tratamiento con eritromicina en niños inmediatamente después de la aparición de los síntomas (diarrea sangrienta) originados por *Campylobacter* tenían una mejor tasa de recuperación (Whitehouse et al., 2018). Sin embargo, ha sido observado que el uso de estos antibióticos como primera línea de tratamiento en humanos tiende al desarrollo de un nivel de resistencia significativa y su eficacia debería ser analizada (Sibanda et al., 2018). Se ha reportado el uso de tetraciclinas, Betalactamasas, gentamicina, clindamicina, meropenem y telitromicina han mostrado una buena respuesta *in vitro* (Whitehouse et al., 2018).

## **2.3 RELACIÓN DE *CAMPYLOBACTER* CON PRODUCCIÓN DE CARNE DE POLLO**

### **2.3.1 Producción de Carne de Pollo**

La importancia del conocimiento de la relación entre *Campylobacter spp* y la producción de carne de pollo recae tanto en la relación entre el agente y las aves como en el importante crecimiento a nivel mundial que ha tenido a lo largo de los años. En la actualidad los pollos de carne se han convertido en importantes fuentes de carne para la humanidad. Sus mayores productores son: América (Norte, Sur y Centro) con más del 40% de la producción mundial, Asia el 34%, Europa el 17%, África el 5% y Oceanía el 1% (Skarp et al., 2015).

Los principales países productores de carne de pollo son Estados Unidos (15, 339, 081.64 MT), China (9, 341, 897.68 MT), Brasil (8, 337, 896.76 MT) y México (2, 223, 539.92) (FAO, 2019). Estos países, junto con Polonia, Alemania, Francia y España representan aproximadamente el 60% de la producción de carne de pollo a nivel mundial y es exportada a través del globo, siendo Brasil el país que exporta más carne de pollo a nivel mundial, seguido de Estados Unidos (Roth et al., 2019). Solo en el 2000 se produjeron 58.5 millones de toneladas, para el 2018 este número fue más que duplicado a 123.205 millones de toneladas. Se estima además que para el año 2023, la industria

avícola sea la mayor industria productora de carne a nivel mundial (130.7 millones de toneladas) (Skarp et al., 2015).

De manera similar a como aumento la producción de carne de pollo a nivel mundial a través de los años, también aumento el número de cabezas de pollos a nivel mundial. Con 12, 495, 530 miles de cabezas de pollo en 1994, subiendo a 20, 244, 638 miles de cabezas de pollo en el 2010 y llegando a 22, 847, 062 miles de cabezas de pollo en el 2017. La población de pollos de carne a nivel mundial se distribuye: Asia (53.3%), América (26.8%), Europa (10.9%), África (8.2%) y Oceanía (0.7%). Siendo China el país con más cabezas de pollo, seguido por Estados Unidos, Indonesia y Brasil. (FAO, 2019).

Perú es considerado el mayor consumidor de pollo de todo Latino América con una producción creciente que lo coloca como el 4to país productor de pollos de engorde en Latino América (Actualidad Avipecuaria, 2019). En Perú el consumo per cápita de carne de pollo en el 2018 fue de 49.45 kg/hab/año y la industria avícola en general represento el 25.4% del PBI agropecuario (21.5% de carne de ave). En el 2017 se estimaron 156, 638 miles de cabezas de pollo (FAO, 2019) y en el 2018 la producción de carne de pollo fue de 1 688 miles de toneladas. La carne de pollo represento en el 2018 el 77% del total de productos avícolas ofrecidos, seguido de: huevos (18%), carne de gallina (2%), carne de pavos (1%) y carne de otras aves (2%). En el 2018 el departamento de Lima represento el principal productor de carne de pollo (55.4%), seguido de la Libertad (18.3%) y Arequipa (10.4%) (MINAGRI, 2018).

### **2.3.2 Campylobacter en el Ave**

Entre las especies destinadas al consumo humano se considera a las aves, principalmente a las de consumo; como los reservorios óptimos debido a sus características fisiológicas y de crianza (Pergola et al., 2017; Sibanda et al., 2018). La presencia de *Campylobacter spp.* en las aves es bastante cercana a la de un comensal y aunque el número de UFG/g que se pueda obtener de muestras de estas aves sea mayor a  $10^8$ , *Campylobacter spp.* no logra causar cambios en la mucosa cecal ni enfermedad en las aves. El tracto gastrointestinal (TGI) de las aves es un ambiente hostil y la persistencia de *Campylobacter spp.* indica que sus capacidades de adaptación a ambientes con factores estresantes son elevadas, más, aún se desconocen mucho de sus factores de sobrevivencia (Bolton, 2015). Hasta la fecha se considera que el microbiota más saludable para un animal es uno diverso capaz de sobrepasar perturbaciones, por lo que es normal asociar

una disminución en su diversidad con la presentación de no solo enfermedades sino en la mayoría de los casos con alteración de los parámetros productivos (Ocejo et al., 2019). Sin embargo, se menciona que en contadas ocasiones y dependiendo del nivel de colonización de *Campylobacter spp.* se puede observar casos de diarrea, dermatitis en las extremidades inferiores lo que afectarían su bienestar (Garcia-Sanchez et al., 2018).

En las granjas de pollos la presencia de *Campylobacter* en el microbiota intestinal es permanente a través de las 4 diferentes estaciones (primavera, verano, otoño e invierno) (Oakley et al., 2018). Sin embargo, se estima que puede ser mayor en los meses de verano en comparación con los meses de invierno, caso contrario del patrón que presenta en las aves silvestres según los estudios (Sibanda et al., 2018).

En las granjas de pollos la prevalencia de *Campylobacter* puede variar entre valores tan bajos como 2% hasta los sorprendentes niveles de 100% con tiempos de colonización altamente variables entre los diferentes galpones (aproximadamente 1 semana una vez ingresado el agente). La transmisión de *Campylobacter* en el galpón de pollos se da por el ingreso del agente al galpón (usualmente del propio entorno del galpón) y su posterior transmisión horizontal entre los pollos (potenciado por su comportamiento coprófago), haciendo que una vez sean colonizados y debido a la velocidad de diseminación de *Campylobacter* permanecen colonizados hasta el centro de sacrificio pues su erradicación es casi imposible (Garcia-Sanchez et al., 2018, Sibanda et al., 2018).

Su velocidad de diseminación, en el caso de *Campylobacter jejuni*, es tan elevada que le permite establecer una población de colonización en las criptas cecales solo 24 horas después de su ingreso a las aves (Bolton, 2015). Si bien se menciona la posibilidad de una transmisión vertical debido a que *Campylobacter spp.* es capaz de contaminar el huevo, la mayoría de los estudios encuentran a los pollos negativos a *Campylobacter spp.* hasta el décimo día; y cuando el grupo se torna positivo los genotipos difieren de aquellos encontrados en sus progenitores (Skarp et al., 2015). Entre los factores propios de las aves de consumo, se considera la edad de saca de los pollos como un factor relacionado con la prevalencia de *Campylobacter spp.* en el galpón; debido a que a mayor edad mayor exposición tienen los animales al patógeno y por lo tanto una mayor probabilidad de adquirir el patógeno en caso de no tenerlo o presentar una mayor carga bacteriana en su tracto intestinal (Garcia-Sanchez et al., 2018). Esta relación que existe entre la edad y la presencia de *Campylobacter* en los pollos se relaciona con su

microbiota, con el ingreso del agente en los primeros días de o semanas de vida su presencia aumenta de manera progresiva hasta llegar a su máxima presentación en la 4ta semana de vida (Ocejo et al., 2019).

Skarp et al. (2015) menciona que existen determinados momentos de la crianza donde se da el mayor porcentaje de quiebres en la bioseguridad del ambiente. El más importante sería la despoblación o saca de animales, luego la contaminación cruzada de áreas limpias con áreas contaminadas; ambas mayormente ocasionadas por una falta de preparación del personal. Otro factor de bioseguridad importante es el efecto protector de no tener otra granja o galpón infectado en un radio de 2km (Sibanda et al., 2018).

Aparte de los métodos de control, también se mencionan cuáles serían los principales factores de riesgo para el aumento de la prevalencia de *Campylobacter spp.*: La disminución del periodo de descanso, elevado número de trabajadores, falta de higiene en la granja, la presencia de otros animales de granja, despoblación parcial, insectos y roedores y cambios estacionales (Garcia-Sanchez et al., 2018). El tiempo de descanso juega un rol muy importante, periodos menores a 9 días aumentan de manera drástica el riesgo de contaminación de un nuevo grupo de pollos con *Campylobacter spp.* y periodos mayores a 14 días disminuyen las posibilidades de contaminación con bacterias residuales; sin embargo, esto sucede solo si las condiciones de higiene y bioseguridad se mantienen durante todo el tiempo (Sibanda et al., 2018).

En relación con las fuentes de agua se conoce que el uso de agua publica en comparación con fuentes de agua privada está relacionada con un menor riesgo de contaminación con *Campylobacter spp.* así como el uso de un sistema de bebederos nipple sin copa (Sibanda et al., 2018). Además, la forma de *Campylobacter spp.* VPNC (Viable pero no cultivable) juega un rol por el momento desconocido en la contaminación y persistencia de ciertos genotipos en los galpones, centros de sacrificio y su subsecuente impacto en la salud pública por la capacidad de sobrevivencia que posee en este estado (Sibanda et al., Garcia-Sanchez et al., 2018)

### **2.3.3 *Campylobacter* en las instalaciones**

Sibanda et al. (2018) hace un resumen de la eficacia de los diferentes métodos de control contra *Campylobacter spp.* en las granjas. Uno de los principales es un plan de desinfección adecuado, el cual logra disminuir la prevalencia de *Campylobacter spp.* de

un 80% a menos de un 40%. El uso adecuado y mantenimiento (semanal) de pediluvios disminuye de manera drástica la probabilidad de contaminación de ambientes, su uso inadecuado por otra parte los convierte en un factor de riesgo para la contaminación por su ubicación cercana al galpón de broilers. El calzado inadecuado o contaminado permite el ingreso de *Campylobacter spp.* y su proliferación en los pollitos bebés.

La prevalencia en los galpones de pollos también se ve afectada por la presencia de vectores como moscas y escarabajos, quienes juegan un rol importante en la diseminación del agente. Siendo por lo tanto la instalación de papeles atrapa moscas una medida de control, capaz de disminuir la presencia de *Campylobacter spp.* de un 41.4% a un 10.3%, inclusive con granjas de pollos positivas a 4 km de distancia. Cabe mencionar la persistencia del agente en estos vectores, puesto que moscas o escarabajos directamente relacionados con zonas de producción avícola suelen resultar positivos para el análisis de *Campylobacter spp.* (Skarp et al., 2015).

Está claro que existen múltiples medidas de bioseguridad para controlar o disminuir los riesgos de una contaminación por *Campylobacter spp.* al galpón, pero muchas de estas son demasiado costosas para ser aplicadas, y aun a pesar de ser ejecutadas si el personal no está correctamente capacitado no logran su cometido. La medida de bioseguridad con un mayor índice costo beneficio para la prevención de *Campylobacter spp.* es la implementación de barreras en cada galpón y el uso de material y herramientas independientes (Sibanda et al., 2018; Garcia-Sanchez et al., 2018). Y que el procedimiento de mayor costo beneficio para su prevención es la abolición de la despoblación o saca parcial y el uso del sistema “todo dentro/todo fuera” (all-in/all-out). La reducción parcial de la población de un galpón de pollos es un factor de riesgo tanto para la bioseguridad como para la contaminación con *Campylobacter spp.*, según estudios la reducción parcial origina más de 80% de positividad en el galpón mientras que con la saca completa solo un 43% se mantendría positivo (Sibanda et al., 2018).

A pesar de que se instalen las mejores medidas de bioseguridad, es casi imposible impedir que *Campylobacter spp.* ingrese a la granja y su subsecuente diseminación, así como su esparcimiento en los centros de sacrificio, debido al rol que cumplen las aves (entre otras especies) como portadores y reservorios para el agente (Sibanda et al., 2018). Con respecto a esto se sabe que las cajas de transporte juegan un rol importante en la instalación de *Campylobacter spp.* tanto en el centro de sacrificio como en los galpones

de pollos, puesto que a pesar de ser sanitizadas se identificó mediante análisis genéticos que estas cajas transportarían genotipos idénticos del galpón al centro de sacrificio y viceversa (Garcia-Sanchez et al., 2018; Sibanda et al., 2018).

Los puntos de la cadena de sacrificio donde se realizan el desplumado y el eviscerado son considerados como los más críticos para la contaminación de la carne de pollo con *Campylobacter spp.* dentro de las instalaciones pues poseen una prevalencia de *Campylobacter spp.* que va desde el 12% hasta el 80%. Esto resulta en carcasas de pollos procesados con un mismo genotipo, procedente de su galpón o grupo de pollos, siendo un ejemplo de punto de contaminación cruzada en la cual el mismo genotipo bacteriano puede persistir hasta por 21 días (Garcia-Hernandez et al., 2018). La presencia de un mismo genotipo entre diferentes grupos de pollos de carne indica pobres practicas sanitarias, así como un tiempo de descanso del galpón menor al óptimo (Whitehouse et al., 2018). En contraposición a esto, se conoce que la capacidad que posee *Campylobacter spp.* para proliferar fuera de su hospedero o en alimentos es baja, sin embargo, la cada vez más alta incidencia de este patógeno en carcasas a nivel mundial estaría señalando fallas en los mecanismos que aseguran la inocuidad alimentaria (Fraqueza et al., 2016).

Pero, no se puede enfocar la presencia de *Campylobacter spp.* en la carcasa de las aves solamente a fallas o contaminación durante el procesado de las carcasas de aves, ya que las especies de este género poseen características que les permiten, mediante adaptación genética, el desarrollo de mecanismos para sobrevivir a los procesos que aseguran la inocuidad alimentaria durante la cadena alimentaria avícola. Este sería el caso de genes presentes en la estructura genómica de algunos miembros de la población bacteriana que le permitieran sobrevivir a los procesos realizados durante la cadena alimenticia, explicando porque el genotipo que predomina dentro de una población de *Campylobacter* varia después del faenado. (Wheeler et al., 2019; Yahara et al., 2017).

La mayor presencia de *Campylobacter spp.* en las carcasas de aves a comparación con otras especies se relacionaría con su carencia de algunos genes de respuesta al stress, lo que lo lleva a su gran sensibilidad por la desecación, por lo cual el medio donde se almacenan las caracas de aves, el agua fría, le sería mucho más favorable que otras carnes que son expuestas a corrientes frías de aire, como la res o el cerdo (Bolton, 2015). Por otra parte, la presencia de *Campylobacter spp.* no mantiene los mismos niveles durante todo el año, ya que presenta estacionalidad, dándose que en los meses de verano su

presencia en los pollos de consumo, así como los casos de campylobacteriosis son mayores en comparación con meses de invierno caracterizados por una menor temperatura (Skarp et al., 2015).

Su presencia también varía entre las piezas de la carcasa, aquellas que se venden sin piel o menos piel; como filetes de pecho; tienen menor número de *Campylobacter spp.* que su contraparte comercializada con piel (Skarp et al., 2015). Además, y de manera interesante, se ha documentado que la especie predominante de *Campylobacter spp.* (con respecto a *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*) cambia durante el procesamiento de las aves; *Campylobacter jejuni* es la especie predominante en heces, durante el sacrificio y centro de acopio la especie predominante es variable, mientras que *Campylobacter coli* predomina en las carcasas de aves puesta al consumo (Han et al., 2016).

#### **2.3.4 El Uso de Antibióticos en la Industria Animal**

El uso de los antibióticos en 1951 significó un gran logro para la industria animal, permitiendo controlar enfermedad, obteniendo así una mejor eficiencia de la alimentación. Esto explica por qué su uso, sumado a estrictas normas de higiene e implementación de bioseguridad permitió el amplio crecimiento que tuvo la industria avícola en los últimos años, por medio de la prevención de diferentes enfermedades. Sin embargo, el uso de los antibióticos es solamente para el manejo (tratamiento o prevención) de enfermedades bacterianas (Mehdi et al., 2019). Y entre los principales antibióticos utilizados en la avicultura se encuentran los macrólidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas; siendo los dos primeros la primera línea en el tratamiento de la enfermedad causada por *Campylobacter spp.*, esta relación se considera como una posible causa para la aparición de cepas resistentes (Skarp et al., 2015; Zhang et al., 2016; Bolinger y Kathariou, 2017).

Es posible convertir una bacteria comensal del microbiota en una resistente por medio del uso incorrecto de antibióticos y en la Medicina Veterinaria el uso de antibióticos como promotores del crecimiento actúan en parte remodelando la diversidad y densidad de la población bacteriana en el microbiota (García-Sánchez et al., 2018, Mehdi et al., 2018). Pudiéndose tomar de ejemplo a las tetraciclinas que representan aproximadamente dos tercios del total de antibióticos utilizados en la industria animal de los Estados Unidos y aproximadamente un tercio en la Unión Europea (Mehdi et al., 2018).



Las fluoroquinolonas tienen por mecanismo la inhibición de la síntesis de ADN dirigiéndose a las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. La resistencia a este grupo era escasa a inicios de los 90s, para mediados de los 90s la resistencia había aumentado; 17% para la ciprofloxacina según la CDC en 1997, de un 1% a un 10% para el ácido nalidixico en 1998 en Minnesota, de 0%-2% a 32%-50% para la ciprofloxacina entre 1989 y 1992 en España. Es importante notar que de manera paralela se empezó a detectar, casi inmediatamente, cepas provenientes de pollos resistentes a este grupo. Coincidiendo con el inicio del uso de las fluoroquinolonas en la medicina veterinaria (principalmente enrofloxacin en 1996 en Estados Unidos y 1987 en la Unión Europea) para el control de la mortalidad causada por *E. coli*. Reforzando esta idea, se observa que en países donde su uso en animales de consumo humano nunca fue aprobado, como Australia, las cepas aún se mantienen susceptibles a la ciprofloxacina (Whitehouse et al., 2018).

Sumado a esto se ha confirmado que el uso de fluoroquinolonas, en los galpones de pollos resulta en un incremento en la resistencia en cepas *Campylobacter spp.* tanto en humanos como en aves (Sibanda et al., 2018). Resultando a largo plazo en que la resistencia adquirida que posee *Campylobacter spp.* hizo que el tratamiento con fluoroquinolonas de rutina o empírica para el tratamiento de la enfermedad en humanos ya no sea considerado apto ni adecuado, haciendo que el uso de macrólidos sea requerido y que pronto no sea posible usar quinolonas (Garcia-Sanchez et al., 2018). Las fluoroquinolonas también son usadas para el tratamiento de enfermedades en otras especies destinadas al consumo humano como los cerdos (colibacilosis y enfermedades respiratorias) y reses (enfermedades respiratorias) (Whitehouse et al., 2018).

Los macrólidos tienen por mecanismo la interrupción de la síntesis proteica a nivel ribosomal dirigiéndose a la subunidad 50S para inhibir la síntesis de proteínas dependientes del ARN; para esto utiliza los nucleótidos 2058 y 2059 del ARNr 23 como sitios de unión (Garcia-Sanchez et al., 2018). La tilosina, tilmicosina, tulatromicina y la tildipirosina son macrólidos utilizados en la industria avícola en China, Europa y Estados Unidos (Liu et al., 2019). Por lo general, las mutaciones que confieren resistencia frente a los macrólidos también confieren resistencia frente a las lincosamidas, pero no frente a las streptograminas.

Se considera que mundialmente los niveles de resistencia frente a macrólidos como la eritromicina es baja, menor al 10%. Lo cual lo mantiene como un antibiótico de

uso en el tratamiento de infecciones por *Campylobacter*, aunque la mayoría de esta información esta solamente relacionada a *Campylobacter jejuni*. (Whitehouse et al., 2018). Sin embargo, en algunos países desarrollados se puede observar valores de hasta el 40%, como en China (Liu et al., 2019). Además, los estudios enfocados a *Campylobacter coli* tienden a reportar niveles de resistencia frente a macrólidos más elevados con rangos que oscilan entre el 17% y el 62%, en algunos casos duplicando valores hallados en estudios anteriores. Una mayor presencia de cepas de *Campylobacter coli* resistentes a macrólidos se asocia con la presentación de casos de campylobacteriosis resistente al tratamiento con azitromicina (Whitehouse et al., 2018).

Se considera que el origen de las enfermedades humanas por cepas de *Campylobacter spp.* resistentes a antibióticos tiene como origen la industria animal y que el uso de antibióticos promueve su aparición (Whitehouse et al., 2018). Pero no todas las especies de *Campylobacter spp.* poseen la misma capacidad de desarrollar resistencia antibiótica, se indica que *Campylobacter coli* representa el mayor porcentaje de cepas resistentes y multidrogo resistentes, encontrándose entre 56% a 100% de resistencia antibiótica en cepas de *Campylobacter coli* mientras que en cepas de *Campylobacter jejuni* este número rodea el 20% (Zhang et al., 2016; Garcia-Fernandez et al., 2018). Entre las cepas resistentes de *Campylobacter spp.*, aquellas aisladas de pollos de carne, implican un riesgo para la salud pública. Ya que existe una relación positiva entre el uso de antibióticos en la industria avícola y la aparición de cepas resistentes en casos de campylobacteriosis humana (Wimalarathna et al., 2013; Skarp et al., 2015; Mehdi et al., 2018).

La importancia del uso correcto de antibióticos en la industria animal se resalta cuando los países que poseen un control en su uso poseen una menor prevalencia de cepas resistentes (Sibanda et al., 2018). En Japón, donde las fluoroquinolonas no son antibióticos de primera elección, los niveles de resistencia son solamente del 16%-25%. En cambio, los países donde el uso de fluoroquinolonas en la industria animal está permitido, como China, poseen niveles de resistencia alrededor del 100% (Whitehouse et al., 2018).

El uso de los antibióticos como promotores del crecimiento está prohibido en los países que conforman o sean parte de la Vigilancia Europea de Consumo de Antibióticos de uso Veterinario; en otros países como Canadá el 84% de los antibióticos destinados a

la industria animal fueron usados en la comida (Mehdi et al., 2018). La FDA de manera progresiva trata de regular el uso de antibióticos en la industria animal según el impacto que estos tienen en la salud humana, cambiando el uso de varios antibióticos para que requieran la receta de un Médico Veterinario capacitado (FDA, 2015). Sin embargo, pueden pasar años hasta que se vean los efectos positivos de estas medidas, tomando de ejemplo a Estados Unidos donde en el 2005 se prohibió el uso de enrofloxacin en pollos, más la resistencia a ciprofloxacina se mantuvo hasta el 2013 en pollos al sacrificio y solo disminuyo de un 17% a un 11% en pollo a la venta (Skarp et al., 2015).

En la Unión Europea, solamente Dinamarca, Suecia y Finlandia no permite el uso de fluoroquinolonas en la industria avícola, por lo que los niveles de resistencia promedio entre los países llega hasta 61% (Whitehouse et al., 2018). En Estados Unidos, China, Polonia y Francia no se permite el uso de eritromicina, ni tylosina en la avicultura sin prescripción Veterinaria (Roth et al., 2019).

Actualmente se busca reemplazar el uso elevado de antibióticos en la industria animal, poniéndose como opciones: 1) El uso de Aditivos fitogenéticos, los que se sugiere promueven el crecimiento, refuerzan el sistema inmune y reducen la respuesta al estrés; algunos teniendo actividad antimicrobiana. 2) Aceites Esenciales, algunos de ellos poseen actividad antimicrobiana (timol, eugenol, carvacrol, etc.), se les ha relacionado con capacidad curativa de tejidos y una mejor calidad de carne en aves. 3) Probióticos, microorganismos vivos que administrados en la dosis adecuada son beneficiosos para el hospedero, mediante una reducción del pH, composición bacteriana y actividad digestiva. 4) Ácidos Orgánicos, son utilizados para proteger el alimento de los animales de la proliferación de hongos y bacterias, además de promover la conversión alimenticia en algunos casos. 5) Prebióticos, son compuestos no digestibles del alimento que promueven el crecimiento bacteriano, proveyendo de una buena salud intestinal a las aves 6) Enzimas, compuestos producidos de la fermentación fúngica o bacteriana, permiten una mejor digestión de los componentes de la dieta como proteínas, glucanos, etc. (Mehdi et al., 2018).

## 2.4 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN CAMPYLOBACTER

### 2.4.1 Características principales

Los antibióticos, ya sea de origen natural o artificial son usados para prevenir la proliferación de bacterias o para eliminarlas, sin embargo, se sabe que su uso excesivo se presta para el desarrollo de resistencia bacteriana. Se define resistencia bacteriana como la habilidad del microorganismo para proliferar en presencia de un antibiótico que usualmente inhibe o elimina a bacterias de esa misma especie (Mehdi et al., 2018).

*Campylobacter spp.* posee resistencia intrínseca o inmunidad hacia ciertos antibióticos (cloxacilina, nafcilina, trimetropim, sulfametoxazol, novobacina, bacitracina, vancomicina y polimixina) probablemente por la falta de puntos diana apropiados y/o sitios de unión de baja afinidad (Garcia-Sanchez et al., 2018).

Con el paso de los años se identifican mecanismos cada vez más específicos y/o eficientes para las diferentes familias antibióticas, esto en relación con la exposición a diferentes antibióticos que tiene *Campylobacter spp.* al ser comensal en muchas especies de consumo humano (Garcia-Fernandez et al., 2018). Pudiendo sintetizar enzimas que inactivan o modifican los antibióticos (B-lactamasa), alterar o proteger los sitios de unión de los antibióticos, expulsión activa de componentes antibióticos por medio de transportadores antibióticos (CmeABC) y una reducida permeabilidad a antibióticos a antibióticos por estructuras únicas en su membrana. Algunas de estas características son endógenas de *Campylobacter spp.* y otras son obtenidas mediante mutaciones o transferencias genéticas. (Garcia-Sanchez et al., 2018; Whitehouse et al., 2018).

Entre los antibióticos han sido reportados en diferentes países la presencia de resistencia frente a: fluoroquinolonas, macrólidos y lincosamidas, cloranfenicol, aminoglucósidos, tetraciclinas, ampicilinas y otras betalactamasas, clotrimazol y tylosina (Alfredson y Korolik, 2007).

La resistencia frente a los aminoglucósidos se da por el mecanismo que modificación o alteración de antibióticos, en este caso las enzimas modificadoras de aminoglucósidos: AphA AphD, AadE, aacA (Garcia-Sanchez et al., 2018). Los mecanismos o vías que posee *Campylobacter* actúan produciendo unas fototransferasa aminoglucósida, las cuales están ampliamente distribuidas en diferentes bacterias tanto Grampositivas como Gramnegativas. Sin embargo, *Campylobacter* es conocido por

poseer genes de resistencia a amino glúcidos presentes en ambos tipos bacterianos (Alfredson y Korolik, 2007).

En el caso de las tetraciclinas, se presenta el mecanismo alteración o protección de los sitios de unión, mediante la proteína TetO sintetizada por el gen *tetO* el cual se une al sitio A ribosomal (Alfredson y Korolik, 2007).

Para los macrólidos, se pueden dar mutaciones puntuales en el dominio V del gen *23s rRNA* en las posiciones 2074 y/o 2075, mutaciones de las proteínas ribosomales, o el mecanismo emergente conferido por los genes *erm*, principalmente al gen *ermB* (Zhang et al., 2016; Florez-Cuadrado et al., 2017; Garcia-Fernandez et al., 2018). Se han observado cepas resistentes, con las mutaciones A2074G y A2075G o mutaciones en proteínas ribosomales L4 (G74D) y L22 (inserciones en las posiciones 86 o 98) (Garcia-Sanchez et al., 2018).

Estas mutaciones no solo les confieren a las cepas resistencia frente a los macrólidos, pero también hacia las lincosamidas y los ketolidos, debido a que comparten sitios de unión en el ARNr de la 23S (Whitehouse et al., 2018). Sin embargo, el nuevo mecanismo conferido por el gen *ermB*, presente en islas genómicas multidrogo resistentes (cromosómico o plasmídico) de *Campylobacter* les brinda resistencia frente a macrólidos, ketolidos, lincosamidas y streptograminas por medio de la producción de la enzima ermB, una metilasa del ARNr que actúa en el ARNr de la 23S por medio de una metilación de un residuo de adenina (A2058) obstaculizando la unión del antibiótico al ribosoma (Flores-Cuadrado et al., 2017).

La resistencia frente a las quinolonas ha ido en aumento desde los inicios de los 90s, asociada principalmente a mutaciones puntuales y únicas en la región de determinación de resistencia frente a quinolonas (RDRQ) de la proteína GyrA, así como el incremento de actividad o mutaciones en la bomba de eflujo CmeABC (Skarp et al., 2015; Zhang et al., 2017).

La bomba de expulsión multidrogo está constituida por CmeA (proteínas periplasmática), CmeB (proteína interna transportadora perteneciente a la división de la superfamilia de resistencia de nodulación celular) y CmeC (proteína externa) (Garcia-Sanchez et al., 2018). Esta le confiere resistencia a un amplio grupo de fármacos (entre ellos las quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos y macrólidos), sales biliares y metales

pesados, así como la resistencia intrínseca a componentes sin relación estructural para *Campylobacter spp.* (Bolton, 2015). La mayoría de las mutaciones (sobre todo las relacionadas a los macrólidos y quinolonas) tienen sinergia con la bomba de eflujo CmeABC y las mutaciones presentes en la CmeR-Box (Zhang et al., 2017; Garcia-Sanchez et al., 2018).

#### **2.4.2 Evaluación de la resistencia antimicrobiana en Placa**

El método de Kirby-Bauer surgió debido a la falta de un protocolo estandarizado para el método de difusión de discos utilizado para la evaluación de resistencia antimicrobiana. Esta prueba tiene como objetivo determinar la sensibilidad o resistencia de un patógeno frente a un grupo determinado de antibióticos. El fundamento de esta prueba es la absorción del líquido del agar por el disco y su posterior diseminación; debido a la velocidad de diseminación del antibiótico en el agar la concentración es mayor mientras más cerca al disco se encuentre. Las bacterias sembradas previas a la colocación del disco crecen de manera paralela a la difusión del antibiótico a través del agar, indicando el crecimiento de la bacteria que supero los efectos inhibidores del antibiótico (Hudzicki, 2009).

#### **2.4.3 Resistencia genética antimicrobiana en *Campylobacter spp.***

Los genes de resistencia antimicrobiana son los que permiten a las bacterias evadir los efectos de los antibióticos por múltiples mecanismos; además, son transmisibles entre bacterias por diferentes mecanismos de conjugación aumentando así el número de cepas resistentes (Bolinger y Kathariou, 2017). Algunos de estos genes pueden ser cromosómicos o plasmídicos según la cepa, como el gen *tetO* de resistencia a las tetraciclinas (Garcia-Sanchez et al., 2018; Whitehouse et al., 2018).

*Campylobacter spp.* posee cualidades naturales para el desarrollo de mecanismo de resistencia antimicrobiana, como su elevada plasticidad genómica determinada por su aptitud natural y secuencias genómicas hipervariables le confiere facilidad para el desarrollo de mecanismos de resistencia (Garcia-Sanchez et al., 2018). Así como también la presencia de estructuras similares a integrones, sistemas de expresión genética que capaces de integrar uno o más casetes genéticos y convertirlos en genes funcionales (Han et al., 2016). Estas características se ven demostradas cuando la capacidad de adaptación de *Campylobacter spp.* le permite desarrollar resistencia rápidamente aun cuando el nivel de la dosis de fluoroquinolonas es terapéutico (Whitehouse et al., 2018).

*Campylobacter* ha demostrado poseer los mecanismos necesarios para la conjugación y la transformación natural, por lo que cuando adquiere genes de resistencia estos son rápidamente transmitidos entre cepas. Además de haber adquirido algunos de sus genes de resistencia de bacterias Grampositivas, como el gen *tetO* y el gen *aphA-3* (Alfredson y Korolik, 2007).

#### **2.4.3.1 Mutación del gen *gyrA***

La mutación puntual en la región RDRQ (región determinante de resistencia a las quinolonas) del gen *gyrA*, dada por cambios en la posición de aminoácidos, es considerado el mecanismo principal que posee *Campylobacter spp.* frente a las quinolonas (Zhang et al., 2017). Si bien existen diferentes reportes de mutaciones puntuales del gen *gyrA*: Thr86Ile, Asp90Asn, Thr86Lys, Thr86Ala, Thr86Val, y Asp90Tyr (Garcia-Sanchez et al., 2018). Siendo el cambio más observado y que mayor resistencia confiere, Thr86Ile, el cual se da por la sustitución de la Trionina en el codón 86 por una Isoleucina, originado por el cambio C257-T (Changkwanyun et al., 2016).

Si bien se ha reportado la doble mutación en algunas cepas de *Campylobacter*, el cambio único de Thr86Ile es suficiente para el desarrollo de resistencia. Esto se debe a que *Campylobacter* se basta con una única mutación a diferencia de otras bacterias Gramnegativas donde es requerida una doble mutación (Whitehouse et al., 2018). La relación de esta mutación con la resistencia frente a quinolonas es bastante estrecha, encontrándose en varias cepas a nivel mundial con elevados niveles de resistencia (Hormeño et al., 2016). Además, la capacidad funcional de la ADN girasa de *Campylobacter* en la replicación de ADN se mantiene estable entre la mayoría de las diferentes mutaciones, sobre todo en Thr86Ile donde presenta niveles idénticos al de cepas sin cambios (Changkmanyeun et al., 2016).

#### **2.4.3.2 Gen *ermB***

Luego de haber sido reportado por primera vez el año 2014 en una cepa de *Campylobacter coli* proveniente de un cerdo en China (Qin et al., 2014). Este gen fue detectado en cepas de *Campylobacter spp.* de pollos en España y de cerdos en Francia. Su presencia en las cepas de *Campylobacter coli* tendría su origen inicialmente en bacterias grampositivas, siendo incorporado al genoma de cepas de *Campylobacter coli* por transformación natural, siendo un gran ejemplo de transmisión horizontal de genes (Liu et al., 2017; Esson et al., 2016; Wei y Kang, 2018).

En los últimos años el gen *ermB* ha sido reconocido como un mecanismo emergente de resistencia antimicrobiana frente a los macrólidos a nivel mundial, siendo hallado en diferentes países (Chen et al., 2018). Así mismo los resultados obtenidos por medio de estudios in vitro demostraron que *Campylobacter coli* es capaz de transferir con gran facilidad este gen a *Campylobacter jejuni* por su cercanía (Zhang et al., 2016), esta capacidad sería de vital importancia debido a que *Campylobacter jejuni* es la responsable de más del 90% de casos humanos de campylobacteriosis donde la azitromicina, antibiótico del grupo de los macrólidos, es la primera línea de tratamiento (Sibanda et al., 2018). Explicando por qué los países donde se ha detectado su presencia y circulación poseen índices más elevados de resistencia frente a macrólidos en cepas de *Campylobacter* que otros países de su región (Whitehouse et al., 2018).

Así mismo la presencia de este gen, y según la prevalencia, tiende a estar relacionado con la transmisión de genes e islas genómicas de resistencia multidrogo en las poblaciones de aves, que puede llegar a ocasionar una transmisión zoonótica entre cepas de *Campylobacter*, sobre todo *Campylobacter coli* (Zhang et al., 2016; Liu et al., 2019). Debido a que las cepas obtenidas de otras especies (cerdos o reses) poseen principalmente la mutación del dominio V del gen *ARNr 23S* (Zhang et al., 2016; Liu et al., 2017).

Este gen suele estar asociado a IGRMD (Islas Genómicas de Resistencias Multi-Drogo), porciones del genoma cromosómico o plasmídica donde se encuentran agrupados diferentes estructuras genéticas que confieren resistencia a uno o más antibióticos, en el caso de las cepas de *Campylobacter spp.* (Liu et al., 2017).

Las IGRMD donde se encuentra el gen *ermB* pueden poseer las estructuras genéticas capaces de otorgar resistencia frente macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, aminoglucósidos, tetraciclinas (Liu et al., 2017). Entre sus componentes, se pueden encontrar 8 genes de resistencia antimicrobiana: *ermB*, *tetO* y 6 genes de resistencia frente aminoglucósidos (*aacA-aphD*, *aac*, *aadE*, y el clúster genético *aadE-sat4-aphA3*) (Whitehouse et al., 2018). A la fecha se han identificado 12 diferentes clases de IGRMD, presente mayormente a nivel cromosómico, relacionadas con *Campylobacter* que cargan el gen *ermB*, de estas solo 3 han sido encontradas en *Campylobacter jejuni* mientras que el resto se encuentran únicamente en *Campylobacter coli* (Liu et al., 2019).



Se considera que la capacidad adaptativa de *Campylobacter coli* la vuelve más apta que *Campylobacter jejuni* para poblar a las especies donde el uso de macrólidos ejerce una mayor presión biológica (Whitehouse et al., 2018). Y que los tipos de IGRMD predominantes entre las cepas presentes en casos humanos son similares a las aisladas en animales (Liu et al., 2019).

Para lograr un manejo adecuado de las cepas resistentes se desarrollaron en diferentes países programas de vigilancia antimicrobiana que recogen diferentes cepas bacterianas de los diferentes puntos de la cadena alimenticia: los animales de producción, los centros de venta y sacrificio, los humanos (consumidores o trabajadores) (Whitehouse et al., 2018).

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.1 TAMAÑO MUESTRAL

Para el estudio de presencia de *Campylobacter spp.* es requerido el cálculo del número mínimo de muestras de aves evisceradas de mercados de Lima Metropolitana. Para lo cual se aplica la fórmula de tamaño muestral para variables cualitativas en población finitas (Aguilar-Barojas, 2005).

$$n = \frac{NZ^2pq}{Z^2pq + (N-1)e^2}$$

Donde:

- N: Numero de aves vendidas en mercados (MINAGRI, 2018)
- Z: nivel de confianza (95%).
- p: proporción estimada (0.167) (Lucas et al, 2013).
- q: complemento de p (1 – p) (0.833)
- e: error máximo permisible (0.067)

$$\frac{(249.7 \times 10^6) \times (1.96)^2 \times (0.167) \times (0.833)}{((249.7 \times 10^6) - 1) \times (0.067)^2 + (1.96)^2 \times (0.167) \times (0.833)} = 119.048$$

El valor obtenido (119.078) fue redondeado a 120 y dividido proporcionalmente entre los mercados según su impacto proporcional en la venta de pollo según informe del MINAGRI en el 2018. Resultando 70, 30 y 20 para los mercados de los distritos de Independencia, San Martín y Santa Anita respectivamente.

## **3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

### **3.2.1 Obtención y procesamiento de muestras**

Para el aislamiento de cepas de *Campylobacter spp.* se recolectaron 120 muestras de los mercados de Independencia, San Martín de Porres y Santa Anita. Las muestras fueron transportadas en una caja isotérmica con ice pack entre 4° y 8° C al laboratorio de Farmacología de la FMV de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su posterior procesamiento.

Cada muestra recolectada (piel) fue procesada en una superficie estéril y con material estéril (pinzas y bisturí) obteniéndose una submuestra de 10 gr, la cual fue envuelta en papel aluminio.

### **3.2.2 Pre-enriquecimiento**

Las muestras obtenidas (10g) fueron colocadas en bolsas estériles de primer uso rotuladas a las cuales se les agregó 90 ml de caldo Preston al 5% de sangre (Caldo base N#2, Oxoid®, UK; suplemento Preston, Liofilchem®, Italia; suplemento de crecimiento de *Campylobacter*, Oxoid®, UK; sangre desfibrinada de oveja) como indica el ISO 10272 - 1 obteniéndose una solución 1/10 de cada muestra. Las bolsas fueron colocadas en Anaerójars 2.5 L (Oxoid®, UK) con packs de medio microaerófilo (Campygen, Oxoid®, UK) según las indicaciones del fabricante y una vez esta fue sellada se llevó a la estufa para incubar las muestras durante 24 horas a 42°C.

### **3.2.3 Cultivo en agar selectivo**

El cultivo se realizó según las indicaciones presente en el ISO 10272 – 1. Siendo el agar indicado para el aislamiento de *Campylobacter spp.* en muestras frescas según el agar mCCDA (agar base mCCDA, Oxoid®, UK y vial de suplemento para agar mCCDA, Oxoid®, UK). De cada bolsa de muestra se recolectaron 100 µl posterior a la homogenización y se sembró en las placas de agar mCCDA estéril. El material obtenido

se esparció por medio de un hisopo estéril en una mitad de la placa y en la otra mitad se realizó el agotamiento por estría, para en caso de obtener crecimiento en las placas tener tanto el patrón de crecimiento grupal (útil para el diagnóstico macroscópico) como colonias aisladas para ser resembradas. Las placas fueron colocadas en Anaerogaras con packs de medio microaerófilo según las indicaciones del fabricante y una vez esta fue sellada se llevó a la estufa para incubar las muestras durante 48 horas a 42°C.

#### **3.2.4 Medio no selectivo de confirmación**

Para la confirmación de colonias sospechosas de *Campylobacter spp.* se sembraron (4 - 5) colonias aisladas diluidas en solución fisiológica estéril en agar sangre al 5% (Base de agar sangre N#2, Liofilchem®, Italia con sangre desfibrinada de oveja) de manera similar a la realizada en el agar mCCDA. Las muestras fueron incubadas sin Anaerogara ni packs de medio microaerófilo a 42°C durante 24 a 48 horas. Se evaluó para crecimiento en placa a las 24 horas, de no haber crecimiento visible se mantenían en incubación 24 horas más. Solo las muestras que presentaran crecimiento durante este plazo continuarían en el estudio.

#### **3.2.5 Pruebas morfológicas y bioquímicas**

##### ***3.2.5.1 Evaluación macroscópica***

Las colonias en el agar mCCDA fueron evaluadas macroscópicamente según su conformación, siendo la conformación característica de las colonias de *Campylobacter spp.* a manera de “gotas de rocío” en este medio. Esto fue considerado como un factor excluyente durante el estudio.

##### ***3.2.5.2 Evaluación microscópica de morfología y motilidad***

Se realizó visualización en microscopio óptico (Leica, UK) a 100x de colonias aisladas del agar mCCDA para evaluar morfología y motilidad. Para esto se colocó una gota de agua destilada en una lámina portaobjeto y por medio de un asa de cultivo se tomó una colonia aislada y se homogenizó completamente en el agua destilada, posteriormente se cubrió con una lámina cubre objeto y fue llevada al microscopio óptico para ser visualizada a 100x usando una gota de aceite de inmersión. Siendo los patrones correspondientes para *Campylobacter spp.* la forma helicoidal o bacilar durante las primeras 24 – 48 horas y motilidad similar a un “saca corchos”. Estas dos últimas características fueron consideradas como factores excluyentes.

#### **3.2.5.3 Evaluación de Gram**

Se realizó la tinción Gram de colonias aisladas en el agar sangre. Para esto se colocó una gota de agua destilada en una lámina portaobjeto y por medio de un asa de cultivo se tomó una colonia aislada y se homogenizó completamente, posteriormente se pasó por el mechero hasta estar visiblemente seca. Se agregó cristal violeta durante 1 minuto, se enjuagó con abundante agua, se agregó Lugol durante 1 minuto, se enjuagó con abundante agua, se goteó alcohol durante 2 a 3 segundos, se enjuagó con abundante agua y finalmente se colocó fucsina durante 30 segundos para enjuagar y secar. Posteriormente fue llevada al microscopio óptico para ser visualizada a 100x usando una gota de aceite de inmersión. *Campylobacter spp.* es una bacteria Gramnegativa, bacilar o helicoidal durante las primeras 24 – 48 horas, por lo cual se consideró esto como un factor excluyente.

#### **3.2.5.4 Prueba de Oxidasa**

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. Se depositó un grupo de colonias en una tira reactiva de oxidasa y se froto con el asa de siembra para esparcirla. Los resultados fueron interpretados entre 10 y 30 segundos. *Campylobacter spp.* es positivo, siendo esto considerado como un factor excluyente durante el estudio.

#### **3.2.5.5 Prueba de Catalasa**

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. Se depositó una colonia en una lámina porta objetos, sin tocar el medio por tratarse de agares basados en sangre (pueden dar falsos positivos), se les añadió una gota del reactivo (peróxido de hidrógeno) y se esperó para su lectura entre 10 y 20 segundos. *Campylobacter spp.* es positivo, siendo esto considerado como un factor excluyente durante el estudio.

#### **3.2.5.6 Prueba de Hipurato**

Se evaluaron las muestras para hidrolisis del hipurato. Esta prueba tiene como función diferenciar a *Campylobacter jejuni* (resultado positivo) de las demás especies de *Campylobacter spp.* (resultado negativo). Todos los materiales utilizados pertenecen al Kit de prueba rápida en tubo para detección de hidrolisis del hipurato (Liofilchem®, Italia). Se colocaron de 3 a 4 colonias aisladas del agar sangre a un tubo estéril con 0.2 ml de solución fisiológica hasta obtener una turbidez adecuada. A este tubo homogenizado se le agrego un disco de hipurato, se cerró e incubó a 37°C durante 2 horas. Una vez pasadas las 2 horas se agregaron 2 gotas de reactivo de ninhidrina al 7% (indicador de reacción) y fue incubado nuevamente a 37°C durante un plazo de máximo 20 min. Se evaluó cada 10 minutos para cambio en la coloración, el azul o violeta intenso indicaba positividad cualquiera otro color o versiones más leves de estos eran considerados negativos de manera preliminar para *Campylobacter jejuni*.

#### **3.2.6 Cepas control**

Para las pruebas realizadas se utilizaron las cepas control *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 y *Campylobacter coli* ATCC 33559 en formato de hisopo Kwik- Stik™ (Microbiologics, Inc., USA). Ambas cepas fueron reactivadas según las indicaciones del fabricante en agar sangre (5%) durante 48h en condiciones de microaerófilo a 37°C. De manera semanal, las cepas control almacenadas ya revividas del agar sangre y pre enriquecidas en caldo BHI eran resembradas en agar sangre para tenerlas a disposición. Las cepas control fueron utilizadas para realizar el control de calidad de los medios (Preston, mCCDA, y Muller Hinton y Sangre) y pruebas realizadas (Pruebas bioquímicas: Oxidas, Catalasa e Hipurato, PCR: Genero y especie y sensibilidad antibiótica).

### **3.3 CONFIRMACIÓN MOLECULAR**

#### **3.3.1 Extracción de ADN**

Las muestras compatibles con *Campylobacter spp.* fueron conservadas en una solución de BHI y Glicerol (80/20) en congelación. Asimismo, se prepararon viales con 1ml de soluciones McFarland 0.5 de cada muestra por duplicado para su análisis molecular (PCR) para especie y genes de resistencia. Las cepas control también pasaron por este procedimiento, siendo preparados 3 viales. La extracción de ADN se realizó

según las especificaciones del fabricante del Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®).

### **3.3.2 PCR para análisis de género y especie**

Para la identificación mediante género por PCR se utilizó el primer de la secuencia universal 16-rRNA para todas las especies de *Campylobacter spp.* descritos por Frasa et al., 2017. Para la identificación mediante especie por PCR se utilizaron los primers del gen glyA (*Campylobacter coli*) y el gen lipO (*Campylobacter jejuni*) descritos por Linton et al., 1997) (Tabla 1).

Se utilizó 5ul de ADN de cada muestra con 20 ul de Mix de PCR: 6,5 µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas; 12,5 µl de tampón de PCR a 2X (GoTaq®G2 Green Máster Mix); en el caso del género se utilizó 0,5 µl del primers 16-rRNA F (20 µM); 0,5 µl del primers 16-rRNA R (20 µM) mientras que para especie se realizó un mix para PCR multiplex: 0,25 µl del primers GlyA-R (20 µM), 0,25 µl del primers lipO-F (20 µM), 0,25 µl del primers lipO-R (20 µM).

Una vez completada la mezcla fue llevada al termociclador bajo el siguiente ciclo térmico para género: 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos compuestos por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 59°C para género, 2 minutos a 72°C y un paso final de extensión de 10 minutos a 72°C e incubación a 4°C. y el siguiente para especie: 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos compuestos por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C para género, 2 minutos a 72°C y un paso final de extensión de 10 minutos a 72°C e incubación a 4°C. y el siguiente para especie. Se incluyeron un control negativo en el que se colocó agua miliQ estéril en el lugar del ADN y un control positivo tanto para *Campylobacter coli* como para *Campylobacter jejuni*.

El producto del PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Agarosa, Promega®, USA) en tampón TAE 0.5x con RedSafe al 5% durante 70 minutos a 100V para poder visualizar las bandas de ADN. La visualización del producto se realizó mediante un transiluminador con luz UV. El tamaño de los productos se confirmó con el marcador molecular GenRuler 100pb.

### **3.4 EVALUACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA**

#### **3.4.1 Evaluación de la sensibilidad antibiótica**

Se realizó la prueba de Kirby-Bauer según las indicaciones del EUCAST, preparándose una solución de Mc Farland 0.5 con las colonias aisladas en las estrías de las placas de agar sangre compatibles con *Campylobacter spp.* las cuales fueron sembradas en placas de agar Müller Hinton sangre al 5% (Agar Müller Hinton, CONDALAB®, España) por medio de un hisopo estéril. En la placa Petri se colocaron los discos de antibióticos (sensidiscos), Oxoid®, UK: eritromicina (15 µg), azitromicina (15 µg) y ciprofloxacino (5 µg). Las placas fueron incubadas en medio microaerófilo durante 48 horas a 42.5°C.

Posterior a la incubación se evaluaron las placas para sensibilidad antibiótica por medio de la medición de los halos de inhibición de estar presentes. Se tomaron las indicaciones del EUCAST (2019) para evaluación de resistencia frente a los diferentes antibióticos utilizados (Eritromicina y Azitromicina (< 24 mm para *Campylobacter coli* y < 20 mm para *Campylobacter jejuni*) y Ciprofloxacino (< 26 mm para el género *Campylobacter spp.*).

### **3.5 DETECCIÓN DE GENES**

#### **3.5.1 Extracción de ADN**

El ADN que se utilizó fue el mismo obtenido para la confirmación de género y especie.

#### **3.5.2 PCR para detección del gen *ermB***

Para la detección del gen *ermB* mediante PCR se utilizó el primer descrito por Butcher et al., 2017 (Tabla 1).

Para la realización del de PCR para el gen *ermB* se utilizaron 5ul de ADN de cada muestra con 20ul de Mix de PCR: PCR 2X 12,5µl, 0,25µl de cada primer (20 µM), 7µl de H<sub>2</sub>O. Una vez completada la mezcla fue llevada al termociclador bajo el siguiente ciclo térmico: 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos compuestos por 40 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C y un paso final de extensión de 7 minutos a 72°C e incubación a 4°C. Se incluyó un control negativo en el que se colocó agua miliQ estéril en el lugar del ADN.



El producto del PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Agarosa, Promega®, USA) en tampón TAE 0.5x con RedSafe al 5% durante 70 minutos a 100V para poder visualizar las bandas de ADN. La visualización del producto se realizó mediante un transiluminador con luz UV. El tamaño de los productos se confirmó con el marcador molecular GenRuler 100pb.

Para la validación de esta prueba, fueron enviados para su secuenciamiento a Macrogen Inc. (Seúl, Corea), 10 productos de PCR seleccionados de forma aleatoria que amplificaron el gen *ermB*. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas utilizando los programas SeqMan, EditSeq y MegAlign del software Lasergene (DNASTAR, Madison, WI, USA). Nuestras secuencias fueron comparadas con las secuencias de referencia del gen *ermB* y depositadas en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) con los números de accesos MN461237 al MN461246.

### **3.5.3 PCR para detección de la mutación Thr86Ile del gen *gyrA***

Para la detección de la mutación del gen *gyrA* mediante PCR se utilizó el primer descrito por Sierra et al., 2015 (Tabla 1) y la enzima de restricción RsaI (R6371) (Promega®, USA).

Para la realización del de PCR para el gen *gyrA* se utilizaron 5ul de ADN de cada muestra con 20ul de Mix de PCR: PCR 2X 12,5µl, 0,25µl de cada primer (20 µM), 7µl de H<sub>2</sub>O. Una vez completada la mezcla fue llevada al termociclador bajo el siguiente ciclo térmico: 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos compuestos por 40 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C y un paso final de extensión de 7 minutos a 72°C e incubación a 4°C. La visualización y análisis de los productos de PCR se realizó de forma similar a lo descrito para género y especie. Se incluyó un control negativo en el que se colocará agua miliQ estéril en el lugar del ADN y un control positivo (ATCC *Campylobacter coli* 33559).

El producto del PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Agarosa, Promega®, USA) en tampón TAE 0.5x con RedSafe al 5% durante 70 minutos a 100V para poder visualizar las bandas de ADN. La visualización del producto se realizó mediante un transiluminador con luz UV. El tamaño de los productos se confirmó con el marcador molecular GenRuler 100pb. Los productos de la PCR fueron

cortados del gel y aplicados el buffer de digestión. 7 µl del producto obtenido fueron mezclados con 3 µl de la enzima de restricción, posteriormente fueron incubados a 37° C durante 2 horas y finalmente se desnaturalizo la enzima a 65°C durante 15 minutos en un Termobloque. Luego de reposar el producto a 4°C el producto digerido fue corrido en un gel de Agarosa al 3% durante 150 minutos a 120V.

Se utilizo un marcado molecular GenRuler de 50 pb para visualizar el producto de la PCR (179 pb) asi como la presencia de la partición de este por efecto de la enzima de restricción, lo cual generaría productos de 125 pb y 54 pb. La partición en las bandas de ADN correspondería a la no presencia de la mutación buscada en el estudio, de mantenerse el producto intacto en su totalidad se consideraba positiva para la mutación buscada, caso contrario sería considerado negativo. Se utilizaron las cepas ATCC como controles negativos.

### 3.5.4 **Primers Utilizados**

En la Tabla 1 se describen los primers utilizados, su secuencia, el producto esperado según la referencia del autor, y esta misma.

*Tabla 2 Primers utilizado en el estudio*

| GEN                    | SECUENCIA  | Producto | REFERENCIA              |
|------------------------|--|----------|-------------------------|
| 16-rRNA F<br>16-rRNA R | ATCTAATGGCTTAACCATTAAC<br>GGACGGTAACTAGTTTAGTATT                                       | 857 pb   | Frasao et al.,<br>2017  |
| lipo F<br>lipo R       | GAA GAG GGT TTG GGT G<br>AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG                                       | 735 pb   | Linton et al.,<br>1997  |
| Gly-A F<br>Gly-A R     | CATATTGTAAAACCAAAGCTTATCG<br>AGTCCAGCAATGTGTGCAATG                                     | 133 pb   | Linton et al.,<br>1997  |
| ermB F<br>ermB R       | GGGCATTTAACGACGAAACTGG<br>CTGTGGTATGGCGGGTAAGT   | 421 pb   | Butcher et al.,<br>2017 |
| gyrA F<br><br>gyrA R   | AAATCTGCTCGTATAGTAGGGGATGTTAT<br>CGGTAAGTATCATCCACATGGCGGT<br><br>TCAGTATAACGCATCGCAGC | 179 pb   | Sierra et al.,<br>2015  |

### 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio se realizó mediante estadística descriptiva. En las muestras de piel de pollo se evaluó ausencia o presencia de *Campylobacter spp* para cada una. La prevalencia fue obtenida mediante la relación de las muestras positivas con respecto al total de muestras evaluadas (120). En la evaluación fenotípica de resistencia antimicrobiana se evaluó según el EUCAST para cada antibiótica, como resistente o sensible para cada muestra. Calculándose la frecuencia de muestras resistentes como la relación entre las muestras resistentes a cada antibiótico con respecto al número total de muestras evaluadas para resistencia antimicrobiana fenotípica. Para el análisis de frecuencia de *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni* se calculó la relación del número de muestras confirmadas mediante PCR para cada especie respectivamente con respecto al total de cepas obtenidas en el estudio. Para la frecuencia de detección del gen *ermB* se calculó la relación de las muestras donde se detectó el gen entre el total de muestras evaluadas para este experimento, de manera similar se evaluó la frecuencia de mutación del gen *gyrA*.

## 4 RESULTADOS

Del total de 120 muestras se aislaron 117 cepas (Tabla 2). Todas las cepas aisladas dieron negativo al ser evaluadas para la hidrólisis de hipurato, siendo descartadas como *Campylobacter jejuni*. Su posterior análisis por PCR las identificó como *Campylobacter coli*. Se observó el caldo Preston posterior al pre-enriquecimiento, en donde se apreció un cambio de coloración al pasar de los meses entre las muestras (Figura 1).

Tabla 2. Aislamientos de *Campylobacter* spp. en Mercados de Lima Metropolitana

| Origen de las Muestras | Muestras   | Aislamientos |            | <i>Campylobacter coli</i> |            | <i>Campylobacter jejuni</i> |          |
|------------------------|------------|--------------|------------|---------------------------|------------|-----------------------------|----------|
|                        |            | %            | n          | %                         | n          | %                           | n        |
| Independencia          | 70         | 100%         | 70         | 100%                      | 70         | -                           | -        |
| San Martín de Porres   | 30         | 90%          | 27         | 100%                      | 27         | -                           | -        |
| Santa Anita            | 20         | 100%         | 20         | 100%                      | 20         | -                           | -        |
| <b>Total</b>           | <b>120</b> | <b>97.5%</b> | <b>117</b> | <b>100%</b>               | <b>117</b> | <b>-</b>                    | <b>-</b> |

Figura 1. Caldo Preston posterior al Pre-Enriquecimiento.

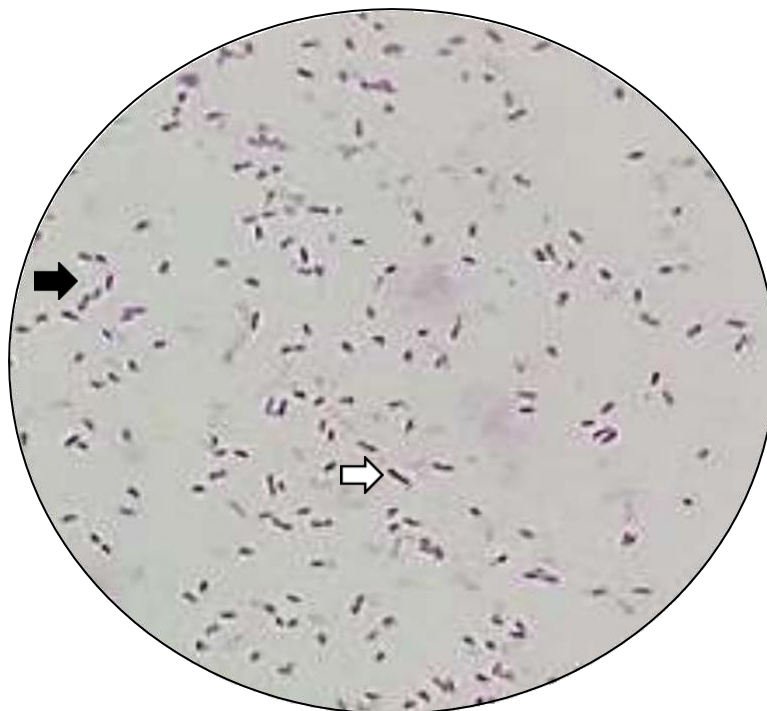


**A.** Muestra C3 (San Martín de Porres). Mes: enero 2019. **B.** Muestra C29 (San Martín de Porres). Mes: febrero 2019. Estas dos muestras representan el cambio de coloración (oscurecimiento) que se presentó de manera progresiva en los caldos posterior al pre-enriquecimiento durante los meses de enero, febrero, marzo y abril. Correspondiendo la Muestra C 29 a la última semana de febrero.

De manera interesante las pruebas de morfología realizadas durante el estudio comprobaron la presencia de 3 diferentes formas bacterianas de *Campylobacter spp.* bacilo-bacilococoide, espiralada y cocoide. Si bien fue posible presenciar las dos primeras al mismo tiempo (Figura 2) la predominancia de una sobre las demás se relacionaba con la edad del cultivo. La forma bacilar fue predominante en las muestras con mayor densidad y en las de mayor tiempo. La forma espiral, si bien es la forma característica conocida como “alas de gaviota” o “S”, solo fue observable en las muestras con una menor densidad de crecimiento y en el primer medio de cultivo (mCCDA).

Las muestras sembradas en agar sangre, debido al estrés ambiental al que estaban expuestas, presentaban casi en su totalidad la forma bacilar y algunas intermedias entre bacilos y cocos, siendo observable en algunos casos células cocoides entre la población total, indicando una respuesta del patógeno al estrés oxidativo. En las cepas ATCC el cambio era más evidente, presentando una proporción visible de células con una forma marcadamente espiralada a las primeras horas, con un cambio rápido a una población mayormente bacilar. Y de manera más resaltante al ser sembradas en el agar sangre, las colonias eran aplanadas blancas como “gotas de pintura” y las células que las conformaban eran netamente cocoides e inertes. La motilidad de manera general se mantuvo entre las células bacilares y espiraladas con un movimiento característico de “sacacorchos” el cual se empezaba a perder en los cultivos de mayor tiempo.

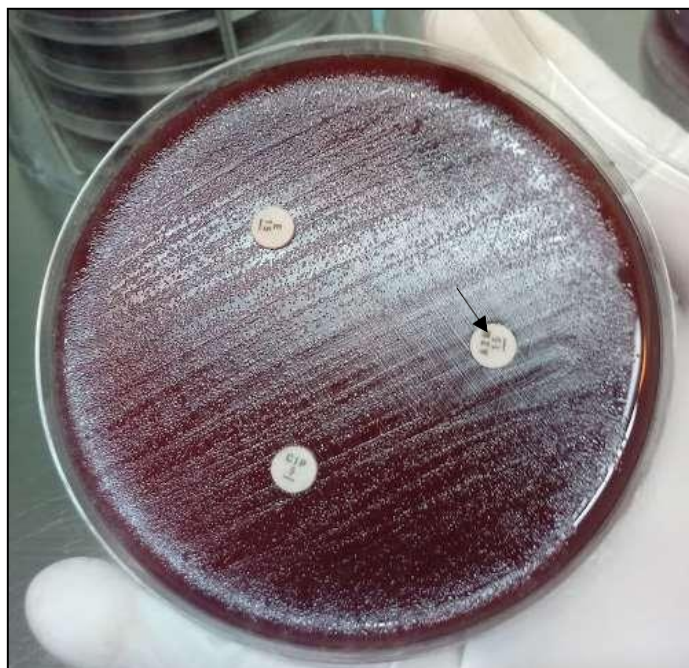
*Figura 2 Tinción Gram de Cepas de Campylobacter spp.*



1000X. **Flecha negra:** Grupo de bacterias Gram negativas con forma abastonada y corta, representando un mayor % de las bacterias visibles en el campo. **Flecha blanca:** Célula gram negativa alargada de forma irregular asemejando una estructura intermedia entre un bastón y espiral, representando un menor % de las bacterias visibles en el campo.

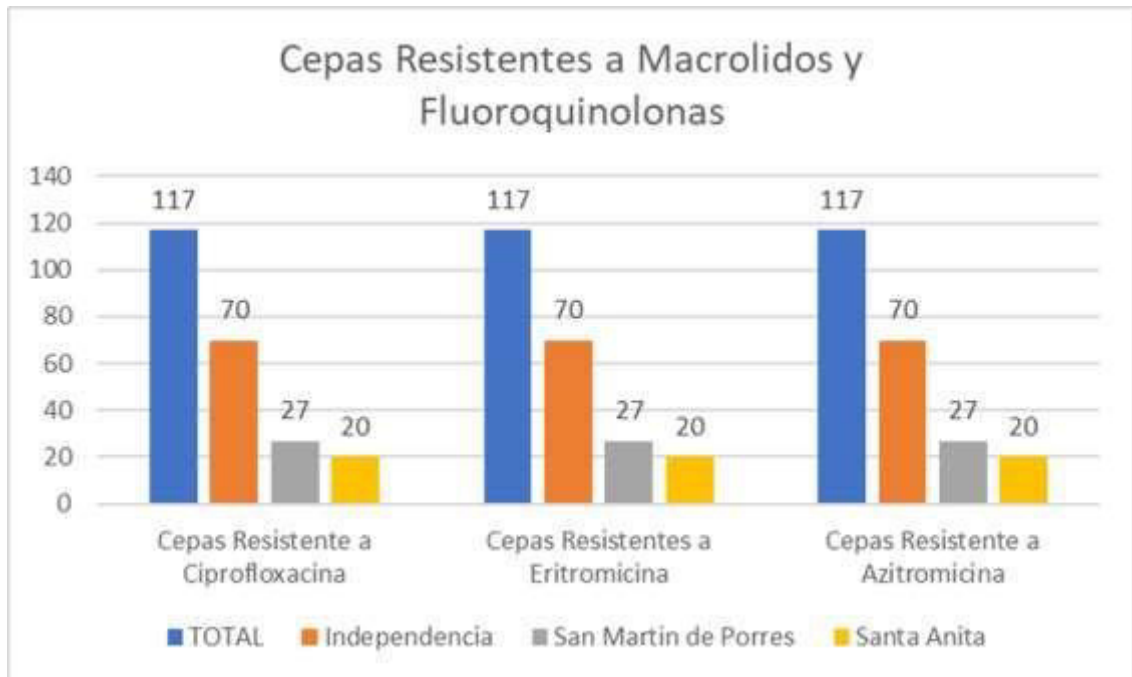
La evaluación de la sensibilidad antibiótica de las cepas aisladas para los antibióticos utilizados en el estudio (Azitromicina (15µg, Eritromicina 15µg y Ciprofloxacina 5µg) (Figura 3) indico que la totalidad de las cepas presentaban resistencia frente a la ciprofloxacina, eritromicina y azitromicina (Fig. 4).

Figura 3. Prueba de Kirby-Bauer de sensibilidad antibiótica (Agar Muller-Hinton Sangre al 5%) con discos de azitromicina (15 µg), eritromicina (15 µg) y ciprofloxacina (5 µg).



Se observa crecimiento bacteriano en la periferia de los discos antibióticos de eritromicina y ciprofloxacina. El crecimiento es menor en la periferia del disco de azitromicina, sin embargo, se puede observar colonias dentro “margen delimitado” indicando un nuevo margen de medición (10 mm).

Figura 4. Cepas Resistentes a Macrólidos y Fluoroquinolonas



Se detectó el gen *ermB* en 62 de las 117 cepas evaluadas (53%) (Figura 5) (Figura 6). Y la mutación Thr86Ile de la RDRQ (Región determinante de resistencia a quinolonas) del gen *gyrA* en 12 de 30 muestras evaluadas (Figura 7).

Figura 5. Producto de PCR gen *ermB* (421 pb). Muestras positivas de los Mercados de San Martin de Porres (C) e Independencia (I).

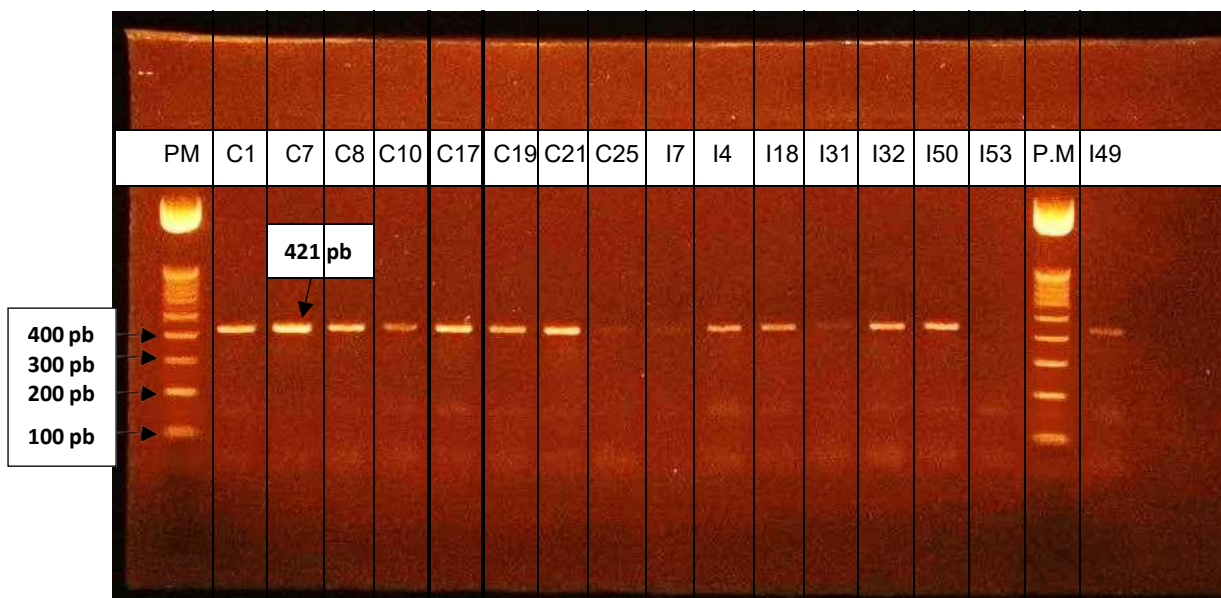




Figura 6. Detección del gen *ermB* en cepas de *Campylobacter coli*

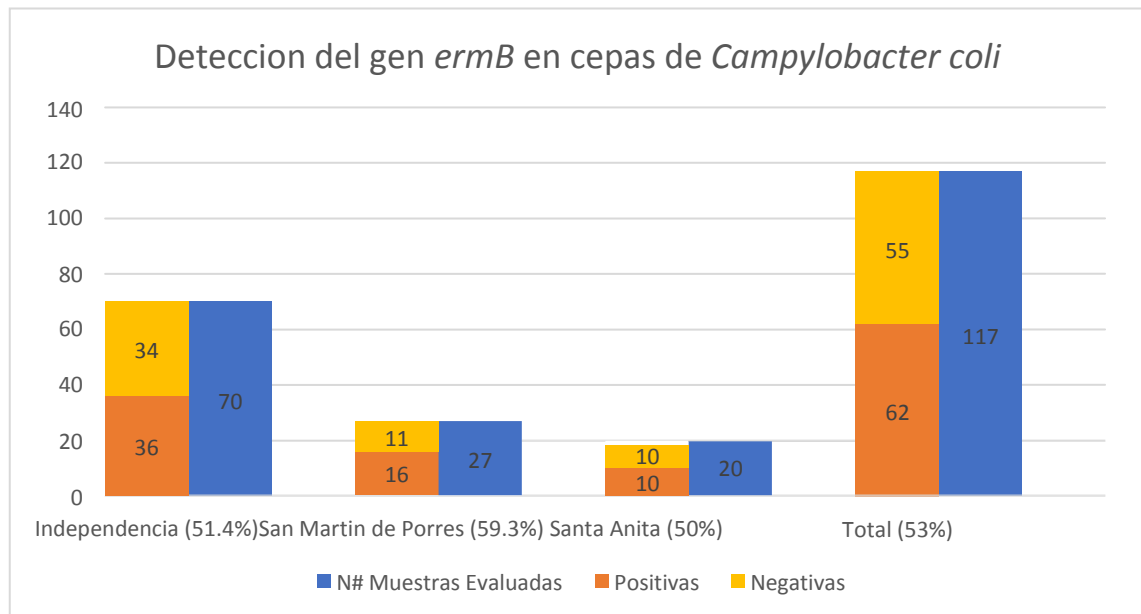
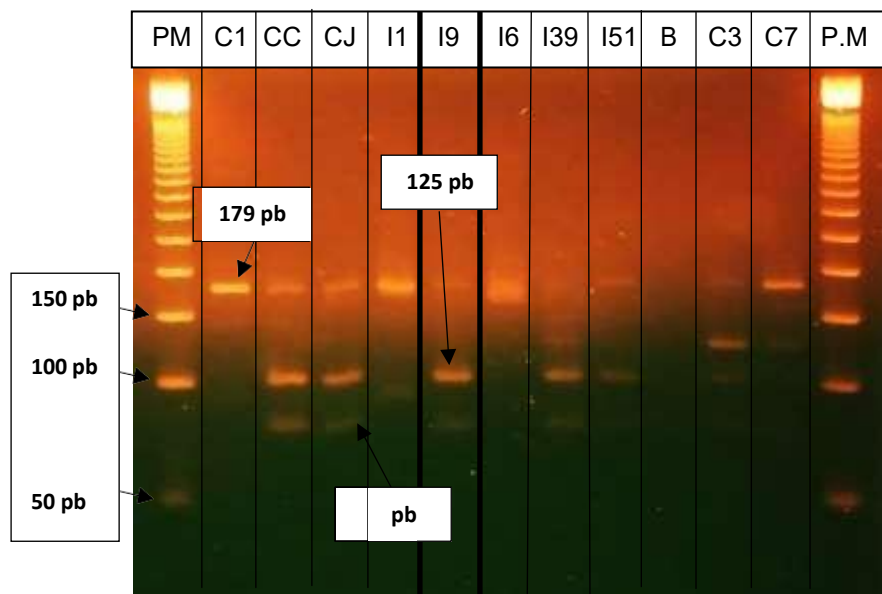


Figura 7. Producto de PCR gen *gyrA* al cual se le aplicó la enzima de restricción. Muestras de los Mercados de San Martín de Porres (C) e Independencia (I). Cepas control: *Campylobacter coli* (CC) y *Campylobacter jejuni* (CJ).



Se evidencia que en las muestras positivas para la presencia de la mutación Thr86Ile del gen *gyrA* (C1, I1, I6) no se aprecia la partición del producto a diferencia de las cepas control (CC, CJ) y las muestras negativas (I9, I39, I51, C3 y C7) en donde se observan las partes del producto entre los por encima (125 pb) y por debajo (54 pb) de los 100 pb. En algunas de estas, si bien aún se observa el producto inicial, la presencia de la partición las señala como negativas. La muestra B corresponde al blanco, donde no se aprecia ningún tipo de producto.

## 5 DISCUSIÓN

---

El porcentaje de muestras positivas de 97.5% (117/120) a *Campylobacter* spp. evidencia una alta carga de este género bacteriano. Debido a que este patógeno se encuentra frecuentemente en el intestino del ave (Frasao et al., 2017), es muy probable que la presencia de cepas *Campylobacter* en la superficie de la carcasa sea relacionado a contaminación por contenido fecal, esto nos sugiere una mala práctica en el beneficio del ave en estos mercados. *Campylobacter* spp. ha sido detectado en carcasas de pollos en diversos países de América Latina. Zumbado et al (2015) identificaron una prevalencia del 50% en pollos en punto de venta en Costa Rica. Por otro lado, Gutierrez et al. (2017) encontraron la presencia de *Campylobacter* spp. en el 63% de las muestras de carne de pollo evaluadas en mercados de Chile. Los últimos reportes en el Perú presentaron porcentajes inferiores al 50%. Lázaro et al. (2012), Lucas et al. (2013) y Espinoza et al. (2015) encontraron la presencia de *Campylobacter* spp. en carcasas de pollo en porcentajes del 15%, 20% y 39.1% respectivamente. Estas referencias nos indican un incremento progresivo en la presencia de *Campylobacter* spp. en los mercados de Lima ya que nuestros resultados evidencian casi un 98% de carcasas contaminadas.

Uno de los factores que podría influenciar en el incremento de *Campylobacter* spp. en pollos de carne es su capacidad de poder adaptarse al hospedero en diferentes situaciones. Sheppard y Maiden (2015) indicaron que cepas de *Campylobacter* expuestas a situaciones de estrés (exposición a antibióticos) desarrollan mecanismos similares de resistencia. Moya et al. (2018) indicó que los casos de campilobacteriosis en niños (uno de los grupos etarios más afectados por la enfermedad) serían más frecuente en la época de verano. Asimismo, Grados et al. (1989) reportaron la exposición de niños a pollos de

traspatio como un factor de riesgo para campilobacteriosis. A nivel mundial, la temperatura elevada del ambiente y la crianza de aves de traspatio son considerados factores de riesgo para la presentación de campilobacteriosis (Nohra et al., 2016).

Tal vez uno de los hallazgos que más resaltamos de este estudio sea que el 100% de las cepas aisladas microbiológicamente fueron confirmadas molecularmente como *Campylobacter coli*. Es importante señalar que en América Latina se tienen reportes de una mayor presentación de *Campylobacter coli* en comparación con lo reportado en América del Norte, Europa y Asia; donde *Campylobacter jejuni* representa aproximadamente el 90% de los aislamientos (Fernandez, 2011). En Perú los estudios de Lázaro et al. (2012), Lucas et al. (2013) y Espinoza et al. (2015) evidenciaron la presencia de *Campylobacter coli* en aves de consumo en un 44%, 40% y 40.4% respectivamente. Estos hallazgos podrían tener una relación con las condiciones de temperatura al momento del muestreo (verano). Se ha demostrado que la prevalencia de *Campylobacter* spp. es mayor en meses de verano (Sibanda et al., 2018), este factor pudo haber favorecido el aislamiento del patógeno de las muestras obtenidas. Otro factor que explicaría la alta prevalencia de *Campylobacter coli* es que este patógeno tiene una mayor tasa de supervivencia cuando se encuentra en el agua en comparación con la exposición directa al aire (Sibanda et al., 2018), esto es importante ya que en los mercados muestreados las carcasas permanecían sumergidas en agua luego del desplumado.

Si bien la alta prevalencia de *Campylobacter coli* en nuestro estudio difiere a lo reportado en otros países Sudamericanos, este hecho no afectaría la presentación de campilobacteriosis ya que su epidemiología sería similar a otros países de la región, donde la presentación de enfermedades y del patógeno es mayor en verano. Esto remarca la necesidad de comprender los patrones de comportamiento en cepas de *Campylobacter*

spp., usando como referencia las características identificadas en otros países, pues como indican Han et al, (2007) es posible identificar una alta diversidad genética en cepas de *Campylobacter*.

Es obvio que las condiciones de los locales donde se realiza el beneficio de las aves están relacionadas directamente con nuestros resultados. Los mercados muestreados presentaban instalaciones inadecuadas para el expendio de productos cárnicos; además, si bien el beneficio del ave no se realizaba en el mismo lugar de expendio, estos mercados cuentan con locales cercanos a los mercados donde se realiza el proceso de sacrificio y desplumado, en esta presentación carcasas eran colocadas en reservorios con agua para su conservación. Según Han et al. (2016), *Campylobacter coli* está más presente en las instalaciones, carcasas y demás componentes relacionados al beneficio, mientras que *Campylobacter jejuni* prevalece en el ave viva y las estructuras donde están son transportadas. Esta relación ya había sido descrita por Lucas et al. (2013) quienes encontraron un mayor porcentaje de cepas de *Campylobacter coli* en las canales de pollos que en los ciegos.

Otro factor determinante es que en los últimos años se han realizado cambios en los métodos de aislamientos de *Campylobacter* spp. En la actualidad se utiliza el medio Preston como medio de pre-enriquecimiento en lugar del medio Butzler el cual tiene mejor respuesta al crecimiento de *Campylobacter coli*. Además, resaltamos la eficacia del uso de la PCR como prueba de confirmación tanto para el género como la especie, debido a las características metabólicas de *Campylobacter* spp. que dificultan su identificación completa en laboratorio por métodos bioquímicos. Singh et al. (2011) demostró que la PCR posee una capacidad similar o superior al aislamiento

microbiológico en relación a la identificación y confirmación por género y especie en cepas del género *Campylobacter spp.* en diferentes tipos de muestras.

Los resultados obtenidos indican un 100% de cepas resistentes a los macrólidos y fluoroquinolonas evaluados, hecho que constituye un riesgo para la salud pública. Diferentes países también han reportado una elevada resistencia en cepas de *Campylobacter* provenientes de pollos de carne. Skarp et al. (2015) encontraron que el 90% de aislamientos en pollos fueron resistente a ciprofloxacina en España. Según Garcia-Sanchez et al., (2018) diversos países de la Unión Europea reportaron niveles de resistencia en rango del 80% al 100%. Simaluiza et al. (2015) detectaron una alta carga de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en hígados de pollo de los cuales un 98 % y 78 % fueron resistentes a ciprofloxacina y tetraciclina respectivamente en Ecuador .

*Campylobacter coli* presenta los mayores niveles de resistencia antimicrobiana a diferentes antibióticos (Zhang et al., 2016; Moya et al., 2018). En un principio se consideraba que la resistencia frente a los macrólidos como la eritromicina era escasa. En Perú solo 7.3% de cepas resistentes frente a la eritromicina en muestras provenientes de niños (Moya et al., 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio se suman a otros donde se indica un aumento de la resistencia frente a macrólidos (Garcia-Fernandez et al., 2018). Zhao et al. (2016), encontraron una resistencia del 45.6% para eritromicina, mientras que Gutiérrez et al. (2017) encontraron que el 87.5% de las muestras de las cepas evaluadas fueron resistentes para la eritromicina. Por otro lado, elevados niveles de resistencia frente a las quinolonas ya se habían reportado en el Perú. Pollet et al. (2012) encontraron resistencia en un 89.8% para ciprofloxacino y 5.3% para eritromicina en muestras humanas. Moya et al. (2018) encontraron un 87% de cepas de

*Campylobacter coli* resistentes a la ciprofloxacina en muestras provenientes de pacientes pediátricos. En general y basándonos en los resultados presentados, en los últimos años la resistencia que posee *Campylobacter* spp. esta en ascenso, principalmente para los macrólidos. Esto nos indica que el uso de macrólidos y fluoroquinolonas como tratamiento para la campylobacteriosis entrara pronto en desuso por la elevada resistencia que ha adquirido. Por este motivo, la OMS considera de extrema importancia el desarrollo de nuevas terapias antibióticas para la campylobacteriosis (Florez-Cuadrado et al., 2017)

Debido *Campylobacter* spp. se encuentra en el tracto intestinal del ave (Frasao et al., 2017), la presentación de resistencia en estas cepas podría sugerir un posible uso incorrecto de antibióticos durante la crianza. *Campylobacter* spp. posee una gran capacidad para adquirir resistencia antimicrobiana debido a su mecanismo de adaptación y su gran variabilidad genética enfocada a la adaptación y supervivencia a cambios metabólicos y estructurales a su entorno (Sheppard y Maiden, 2015; Esson et al., 2016). Se considera que el aumento en la resistencia antimicrobiana en cepas de *Campylobacter* spp. está relacionada con la presencia de genes de resistencia en diferentes grupos bacterianos presentes en la crianza del ave. (Sierra et al., 2015).

En nuestro estudio, la detección del gen *ermB* en el 53% (62/117) de cepas fenotípicamente resistentes a macrólidos lo posiciona como el principal mecanismo de resistencia a macrólidos. Nuestros resultados son superiores a la resistencia a macrólidos obtenida en otros estudios. Du et al. (2019) detectaron un 25.2% de cepas de *Campylobacter coli* provenientes de carne de pollo. Zhang et al. (2016) detectaron un 18.99% de cepas de *Campylobacter coli* poseedoras de este gen, de las cuales 16 de 30 provenían de pollos. En Europa, posterior a la primera detección realizada en el 2016 del

gen *ermB* en una única cepa de *Campylobacter coli*, Flores-Cuadrado et al (2017) encontraron 2 cepas de *Campylobacter coli* poseedoras de este gen proveniente de pavos.

La detección y posible circulación de este gen, cuya característica principal es estar asociado mayormente a islas genómicas de resistencia multidrogo (cromosómicos o plasmídicos) las cuales poseen genes de resistencia para diferentes grupos de antibióticos (Flores-Cuadrado et al., 2016; Wei B y Kang M, 2018), podría sugerir un posible riesgo para la salud pública por la capacidad de *Campylobacter coli* para transmitir este y otros componentes de su genoma a *Campylobacter jejuni*, la principal causante de campylobacteriosis a nivel mundial (Sheppard y Maiden, 2015; Esson et al., 2016; Flores-Cuadrado et al., 2016; Liu et al., 2017; Wei B y Kang M, 2018), la cual posee niveles de resistencia antibiótica mucho menores a los de *Campylobacter coli* (Zhang et al., 2016). Por otra parte, si bien la presencia del gen *ermB* es el principal mecanismo no sería el único, siendo que un 47% de cepas restante no tuvieron dentro de su genoma este gen y deberían su resistencia antimicrobiana a otros mecanismos de resistencia a macrólidos (Whitehouse et al., 2018).

La detección de la mutación Thr86Ile en la RDRQ (Región determinante de resistencia a quinolonas) del gen *gyrA* en 12/30 (40%) de las cepas fenotípicas resistentes a las quinolonas evaluadas, es menor a lo reportado por diferentes estudios a nivel mundial. Du et al. (2018) reportaron un 99.3% de presencia de esta mutación en cepas de *Campylobacter spp.* provenientes de aves. Asimismo, Kang et al. (2017) detectaron esta mutación en casi la totalidad de cepas aisladas resistentes a fluoroquinolonas (91.5%), así como otras mutaciones acompañantes en la RDRQ. Al igual que los macrólidos, se considera que existen una correlación de los genes de resistencia para fluoroquinolonas en cepas de *Campylobacter spp.* proveniente de muestras de casos humanas y de pollos

de crianza; llegando estas cepas a compartir el mismo genotipo y características de resistencia antimicrobiana (Zhang et al., 2016; Reddy y Zishiri, 2017).

Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio podrían indicar la posible actividad de otros mecanismos de resistencia frente a fluoroquinolonas en nuestro medio, tratándose de otras mutaciones en la RDRQ u otros mecanismos de resistencia antimicrobiana. Así como mutaciones en el operón que codifica la bomba de flujo de *Campylobacter* (Kang et al., 2017). Esto podría traer como resultado la aparición de cepas de *Campylobacter* resistentes a fármacos de última generación como la Sitafloraxina (Changkwanyeeun et al., 2016), haciendo que casos de campilobacteriosis ya no puedan ser tratados con fluoroquinolonas, similar a lo sucedido en países de la Unión Europea (Garcia-Sanchez et al., 2018).

Si bien solo se consideraron 2 familias de antibióticos en este estudio, eso no descarta la posibilidad de que las cepas de *Campylobacter* en los mercados evaluados puedan ser multidrogo resistentes. Pergola et al. (2017) encontraron cepas de *Campylobacter coli* resistentes a múltiples antimicrobianos en Italia. Han et al. (2016) evaluaron cepas de *Campylobacter* spp. provenientes de centros de beneficio de aves en China y obtuvieron un 93.8% (272) de cepas MDR (Multidrogo resistentes, resistencia a 2 o más grupos de antimicrobianos) y un 100% de cepas resistentes a al menos uno de los antibióticos evaluados; específicamente para *Campylobacter coli* encontraron 32.23% y 7.97% de resistencia a 6 y 7 grupos de antibióticos respectivamente. En el mismo país, Xinfeng et al. (2019) evaluaron 220 muestras de *Campylobacter* spp. obtenidas de un centro de sacrificio de patos y encontraron que un 75.9% de las cepas fueron MDR. Nguyen et al. (2016) evaluaron muestras de caracas de ave en Vietnam y detectaron cepas de *Campylobacter* spp. resistentes a 7 diferentes grupos de antibióticos entre ellos



eritromicina y ciprofloxacina. Estas referencias nos indican que es necesario futuros estudios con diferentes grupos de antibióticos.

La importancia de la identificación de estos y otros mecanismos de resistencia antimicrobiana en las cepas de *Campylobacter spp.* en Perú, se centran en el hecho de como este microorganismo adquirió el gen *ermB*, probablemente de una bacteria Grampositiva, y lo adaptó a su genoma. Siendo capaz de transferirlo entre otras cepas del género a pesar de tener diferencias genéticas de más del 10%, e inclusive a diferentes bacterias presentes en el tracto digestivo de las aves. Este hecho elevaría el riesgo de la presentación de campilobacteriosis difíciles de tratar y también a que el gen de resistencia esté presente en otros agentes patógenos que afectan al hombre. Recordemos que la carne de pollo es la principal fuente de proteínas en la población peruana (MINAGRI, 2018), por lo que el riesgo de transmisión de bacterias resistentes por carne de pollo es muy alto. Esto nos indica la importancia de la implementación de un sistema de vigilancia para *Campylobacter spp* a nivel de centros de crianza de pollos, centros de comercialización de productos avícolas y evaluación de casos sospechosos de *Campylobacteriosis*.

## 6 CONCLUSIÓN

---

La elevada presencia de *Campylobacter spp.* (97.5%) del cual un 100% pertenece a *Campylobacter coli* indica una elevada contaminación de las carcasas de pollos de carne en los mercados evaluados, esto podría estar asociado a un incremento de *Campylobacter spp.* en los centros de crianza de pollos y también a deficiencias en el proceso de beneficio del ave. Por otro lado, la elevada resistencia hallada a la ciprofloxacina, eritromicina y azitromicina, teniendo al gen *ermB* y la mutación Thr86Ile del gen *gyrA* como principales responsables de la resistencia a macrólidos y quinolonas respectivamente indican un posible mal uso de antibióticos en la crianza de los pollos de carne. Debido a que hay un alto consumo de carne de pollo en nuestro medio, existe riesgo de que *Campylobacter spp.* y sus mecanismos de resistencia sean adquiridos por los consumidores determinando la aparición de enfermedades bacterianas que sean difíciles de erradicar con los tratamientos antimicrobianos convencionales. De manera final se menciona la importancia de implementar programas de vigilancia para *Campylobacter spp.* en busca de controlar su presencia en productos ofrecidos al consumidor, así como monitorear la resistencia antibiótica y su asociación con diferentes tipos de genes que la determinan.

## 7 RECOMENDACIONES

---

- Actualizar y adaptar los procedimientos para la identificación de *Campylobacter spp.* en Lima, Perú
- Investigar e implementar técnicas rápidas y de costos aceptables para el análisis de *Campylobacter spp.*
- Evaluar la resistencia antimicrobiana de *Campylobacter spp.* frente a otros grupos de antimicrobianos.
- Controlar el uso de antibióticos en la industria animal.

## 8 LITERATURA CITADA

---

1. Actualidad Avipecuaria. 2019. Peru, el mayor consumidor de pollo en Latino America. [Internet]. [20 septiembre 2019]. Disponible en: <https://actualidadavipecuaria.com/noticias/peru-el-mayor-consumidor-de-pollo-en-america-latina.html>.
2. Aguilar-Barojas S. 2005. Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. Salud en Tabasco 11 (1-2): 333-338
3. Alfredson D, Korolik V. 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanism in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. FEMS Microbiology Letters, Volume 277, Issue 2, December 2007, Pages 123–132
4. Butcher J, Stintzi A. 2017. *Campylobacter jejuni*: Methods and Protocols. Humana Press. USA: New York. 275 pp
5. Bolinger H, Kathariou S. 2017. The current state of macrolide resistance in *Campylobacter spp.*: trends and impacts of resistance mechanisms. Applied and environmental microbiology 83.
6. Bolton D. J. 2015. *Campylobacter* virulence and survival factors. Food Microbiology, 48, 99–108.
7. Butzler J. 2018. *Campylobacter* Infections in man and animals. CRC Press. U.S.A. 55 pp.
8. Changkwanyeeun R, Yamaguchi T, Kongsoi T, Changkaew K, Yokotama K, Kim H, Suthienkul O, Usui M, Tamura Y, Nakajima C, Susuki Y. 2016. Impact of mutations in DNA gyrase genes on quinolone resistance in *Campylobacter jejuni*. Drug Testing and Analysis, 8(10), 1071–1076.

9. Chen J, Tagg K, Joung Y, Bennett C, Francois L, Eikmeier D, Folster J. 2018. Report of erm(B)+ *Campylobacter jejuni* in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), e02615-02617.
10. Crofts A, Poly F, Ewing C, Kuroiwa J, Rimmer J, Harro C, Trent M. 2018. *Campylobacter jejuni* transcriptional and genetic adaptation during human infection. *Nature Microbiology*, 3(4), 494–502.
11. Debruyne L, Samyn E, De Brandt E, Vandenberg O, Heyndrickx M, Vandamme P. 2008. Comparative performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Research in Microbiology*, 159(2), 88–93.
12. Deza C, & Mendoza J. 2018. Factores críticos que no permiten el ingreso del pollo beneficiado industrialmente en el canal tradicional en Lima Metropolitana. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Lima, Perú.
13. Du Y, Wang C, Ye Y, Liu Y, Wang A, Li Y, Zhou X, Pan H, Zhang J, Xu X. 2018. Molecular Identification of Multidrug-Resistant *Campylobacter* Species From Diarrheal Patients and Poultry Meat in Shanghai, China. *Frontiers in Microbiology*, 9.
14. El-Adawy H, Hotzel H, Dupre S, Tomaso H, Neubauer H, Hafez H. 2012. Determination of Antimicrobial Sensitivities of *Campylobacter jejuni* Isolated from Commercial Turkey Farms in Germany. *Avian Diseases* 56(4): 685–692
15. Espinoza F, Roque M. 2015. *Campylobacter* termotolerante en aves de consumo de los mercados de Lima. *Conoc. amaz.* 6(2): 107-119.
16. Esson D, Mather A, Scanlan E, Gupta S, De Vries S, Bailey D, Harris S, McKinley T, Meric G, Berry S, Mastroeni P, Sheppard S, Christie G, Thomson N, Parkhill J, Maskell D, Grant A. 2016. Genomic variation leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter spp.* *Sci Rep.* 2016 Dec 2; 6:383803.
17. EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. version 9.0, 2019.
18. FAO: Food and Agriculture Organization. 2019: FAOSTAT. [Internet], [11 de septiembre del 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QP>
19. FDA: United States Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. 2015. Veterinary Feed Directive: Food and drug administration. *Federal Register* / Vol. 80, No. 106 / Wednesday, June 3, 2015 / Rules and Regulations.

20. Fernandez H, 2011. *Campylobacter* y Campylobacteriosis: Una mirada desde América del Sur. Rev Perú Med Exp Salud Publica. 2011; 28(1): 121-27
21. Flores-Cuadraro D, Ugarte-Ruiz M, Meric G, Quesada A, Palomo G, Dominguez L, Porrero M. 2016. Description of an erm(B)-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 841–847
22. Flores-Cuadraro D, Ugarte-Ruiz M, Meric G, Quesada A, Porrero M, Pascoe B, Sáez-Llorente J, Orozco G, Dominguez L, Sheppard S. 2017. Genome Comparison of Erythromycin Resistant *Campylobacter* from Turkey Identifies Hosts and Pathways for Horizontal Spread of erm(B) Genes. Front. Microbiol. 8:2240
23. Fraqueza M, Ribeiro A, Pereira S, Fernandes M, Fernandes M, Barreto A. 2016. Genetic and antibiotic resistance profiles of thermophilic *Campylobacter* spp. Isolated from quails (*Coturnix japonica*) in a Portuguese slaughterhouse. Food control 59: 337-344.
24. Frasa B, Marin V, Conte-Junior C. 2017. Molecular Detection, Typing and Quantification of *Campylobacter* spp. In foods of Animal Origin. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol.16,2017.
25. Fridrich E, Blaylock J, Pryjma M, Lee J, Huynh S, Parker C, Girardin S, Vollmer W, Gaynor E. 2019. The *Campylobacter jejuni* helical to coccoid transition involves changes to peptidoglycan and the ability to elicit an immune response. Molecular Microbiology 2019, 0, 1–22.
26. Garcia-Fernandez A, Dionisi A, Arena S, Iglesias Torrens Y, Carattoli A, Luzzi A. 2018. Human campylobacteriosis in Italy: Emergence of Multidrug resistance to ciprofloxacin, tetracycline and erythromycin. Front Microbiol. 2018; 9: 1906.
27. Garcia-Hernandez C, Guadalupe A, Castro G. 2013. *Campylobacter jejuni*: ¿una bacteria olvidada? Situación en México. Enf. Inf. Microbiol. 33(2): 77-84
28. Garcia-Sanchez L, Melero B, Rovira J. 2018. *Campylobacter* in the Food Chain. Adv Food Nutr Res. 2018; 86:215-252.
29. Grados O, Bravo N, Black R, Butzler J. 1989. Diarrea pediátrica debida a la exposición doméstica a pollos vivos en Lima Perú. Bol of Saint Panam. 103(3), 1989.
30. Gutierrez S, Orellana D, Martinez C, Garcia V. 2017. Caracterización de cepas de *Campylobacter jejuni* obtenidas desde carne de pollo y heces de aves de corral de la zona central de Chile. Rev Med Chile 145: 1551-1558

31. Han X, Zhu D, Lai H, Hang Z, Zhou K, Zou L, Wu C, Han G, Liu S. 2016. Prevalence, antimicrobial resistance profiling and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broilers at slaughter in China. *Food Control*, 69: 160-170.
32. Hormeño L, Palomo G, Ugarte-Ruiz M, Porrero M, Borge C, Vadillo S, Piriz S, Dominguez L, Campos M, Quesada A. 2016. Identification of the main quinolone resistance determinant in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by MAMA-DEG PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 84 (2016) 236–239.
33. Hudzicki J. 2009. Kirby-bauer disk diffusion susceptibility test protocol.
34. ISO: International Organization for Standardization. 2017. Microbiology of the food chain -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* -- Part 1: Detection method. ISO 10272-1:2017. Obtenido de: <https://www.iso.org/standard/63225.html>
35. Jayasekara M, Aimi S, Tze Y, Dilan A, Nuzul N, Noor A, John Yew, Dayang F, Yaya R, Yoshitsugu N, Mitsuaki N, Son R. 2017. Prevalence and Antibiotic Resistance against Tetracycline in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Cattle and Beef Meat from Selangor, Malaysia. *Front. Microbiol.* 8: 2254.
36. Kaakoush N, Castaño-Rodríguez N, Mitchell H, Man S. 2015. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Rev*
37. Kang M, Wei B, Choi S, Cha S, Jang H. 2017. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance mechanisms of *Campylobacter* isolates from duck meats. *Journal of Food Protection*, 80(12), 2056–2059.
38. Karikari A, Obiri-Danso K, Frimpong E, Krogfelt K. 2017. Antibiotic resistance of *Campylobacter* recovered from faeces and carcasses of healthy livestock. *Biomed research international* 9.
39. Lazaro C, Conte-junio C, Vilca M, Lucas J, Ramos D, Manchego A, Chiok R, Franco R. M. 2012. Molecular identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from small-scale poultry slaughterhouse in Lima, Peru. *International journal of poultry science* 11: 677-682.
40. Linton D, Lawson A, Owen R, Stanley J. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of clinical microbiology* 35: 2568-72.

41. Liu D, Deng F, Gao Y, Yao H, Shen Z, Wu C, Wang Y, Shen J. 2017. Dissemination of erm(B) and its associated multidrug-resistance genomic islands in *Campylobacter* from 2013 to 2015. *Veterinary Microbiology* 204 (2017) 20–24.
42. Liu D, Liu W, Lv Z, Xia J, Li X, Hao Y, Zhou Y, Yao H, Liu Z, Wang Y, Shen J, Ke Y, Shen Z. 2019. Emerging erm(B)-mediated macrolide resistance associated with novel MDRGIs in *Campylobacter*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 jun 24; 63(7).
43. Lucas L, Vilca M, Daphne R. 2013. Presencia de *Campylobacter spp.* en canales y ciegos de pollos de engorde en Lima, Perú. *Rev Inv Vet Perú* 24 (3): 346-352.
44. Mccrackin M, Helke K, Galloway A, Poole A, Salgado C, Marriott B. 2016. Effect of antimicrobial use in agricultural animals on drug-resistant foodborne campylobacteriosis in humans: a systematic literature review. *Critical reviews in food science and nutrition* 56: 2115-2132.
45. Mehdi Y, Létourneau M, Gaucher M, Chorfi Y, Suresh G, Rouissi T, Kaur S, Côté C, Avalos A, Godbout S. 2018. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition* Volume 4, Issue 2, June 2018, Pages 170-178.
46. Ministerio de Agricultura y Riego. 2018a. Boletín estadístico mensual de la producción de pollo y comercialización de productos avícolas. Perú: MINAGRI. Boletín Estadístico Mensual: febrero 2018. 37 p.
47. Ministerio de Agricultura y Riego. 2018b. Pollo: Comercialización en Lima Metropolitana. Perú: MINAGRI. Nota Técnica N°1: Feb 2018. 11 p.
48. Moya J, Terán A, Salazar R. 2018. Alta resistencia antimicrobiana a fluoroquinolonas por *Campylobacter* en pacientes pediátricos de un hospital peruano. *Rev Perú Med Exp Salud Publica.* 2018;35(1):155-6.
49. Nguyen T, Hotzel H, El-Adawy H, Tran H, Tomaso H, Neubauer H, Hafez H. 2016. Genotyping and antibiotic resistance of thermophilic *Campylobacter* isolated from chicken and pig meat in vietnam. *Gut pathogens* 8: 19.
50. Nohra A, Grinberg A, Midwinter A, Marshall J, Collins-Emerson J, French N. 2016. Molecular epidemiology of *Campylobacter coli* strains isolated from different sources in New Zealand between 2005 and 2014. *Applied and Environmental Microbiology* Jun 2016, 82 (14) 4363-4370.



51. Oakley B, Vasconcelos E, Diniz P, Calloway K, Richardson E, Meinersmann R, Cox N, Berrang M. 2018. The cecal microbiome of commercial broilers chickens varies significantly by season. 2018 Poultry Science 0:1–10.
52. Ocejo M, Oporto B, Hurtado A. 2019. 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow growing chickens throughout their productive lifespan. Scientific Reports. 2019. 9:2506
53. Pergola S, Franciosini M, Comotini F, Ciani M, De Luca S, Bellucci S, Menchetti I, Casagrande Propietti P. 2017. Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. Journal of applied microbiology 122: 1348-1356.
54. Persson S, Olsen K. 2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. Journal of Medical Microbiology 54: 1043–1047.
55. Pollet S, Rocha C, Zerpa R, Patiño L, Valencia A, Camiña M, Guevara J, Lopez M, Chuguiray N, Salazar E, Calampa C, Casapia M, Meza R, Bernal M, Tilley D, Gregory M, Maves R, Hall E, Jones F, Arriola C, Rosenbaum M, Perez J, Kasper M. *Campylobacter* antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. BMC Infect Dis. 2012 Aug 16; 12:193.
56. Premarathne J, Anuar A, Thung T, Satharasinghe D, Jambari N, Abdul-Mutalib N, Huat J, Basri D, Rukayadi Y, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Radu S. 2017. Prevalence and antibiotic resistance against tetracycline in *Campylobacter jejuni* and c. Coli in cattle and beef meat from selangor, malaysia. Frontiers in microbiology 8.
57. Qin S, Wang Y, Zhang Q, Zhan M, Deng F, Shen Z, Wu C, Wang S, Zhang J, Shen J. 2014. Report of ribosomal RNA methylase gene erm(B) in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. J Antimicrob Chemother 2014; 69: 964–968
58. Rodriguez Y, Rojas M, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Ramirez-Santana C, Monsalve D, Gershwin E, Anaya JM. 2018. Guillain–Barré syndrome, transverse myelitis and infectious diseases. Cell Mol Immunol. 2018 Jun; 15(6): 547–562.
59. Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C, Domig K. 2019. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance

- in *Escherichia coli*: A global overview. Poultry Science, Volume 98, Issue 4, April 2019, Pages 1791–1804.
60. Reddy S, Zishiri O. 2017. Detection and prevalence of antimicrobial resistance genes in *Campylobacter spp.* Isolated from chickens and humans. Onderstepoort journal of veterinary research 84: 1-6.
  61. Sheppard SK and Maiden M. 2015. The evolution of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Aug; 7(8).
  62. Sibanda N, McKenna A, Richmond A, Ricke S, Callaway T, Stratakis AC, Gundogdu O, Corcionivoschi N. 2018. A Review of the effect of Management Practices on *Campylobacter* prevalence in poultry farms. Front. Microbiol. (2018) 9:2002.
  63. Sierra Y, Morgan R, Perdoncini G, Lima L, Gomes J, Pinheiro V. 2015 Resistance to  $\beta$ -lactam and tetracycline in *Campylobacter spp.* isolated from broiler slaughterhouses in southern Brazil. Pesq. Vet. Bras. 35(7): 637-642
  64. Silva J, Leite D, Fernandez M, Mena C, Gibbs P, Teixeira P. 2011. *Campylobacter spp.* as a foodborne pathogen: a review. Front. Microbiol., 27 September 2011
  65. Simaluiza R, Zorayda Toledo S, Fernandez H. 2015. The prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken livers used for human consumption in Ecuador. Journal of animal and veterinary advances 14: 6-9.
  66. Singh H, Rathore R, Singh S, Singh P. 2011. Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of *Campylobacter jejuni* in food and faecal samples. Braz. J. Microbiol. vol.42 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2011
  67. Skarp C, Hänninen M, Rautelin H. 2015. Campylobacteriosis: The role of poultry meat. Clin Microbiol Infect 2016; 22:103–109.
  68. Wei B, Cha S, Yoon R, Kang M, Roj J, Seo H, Lee J, Jang H. 2016. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter spp.* isolated from retail chicken and duck meat in South Korea. Food Control, 62, 63-68.
  69. Wei B and Kang M. 2018. Molecular Basis of Macrolide Resistance in *Campylobacter* Strains Isolated from Poultry in South Korea. Biomed Res Int. 2018; 2018: 4526576.
  70. Wheeler N, Blackmore T, Reynolds A, Midwinter A, Marshall J, French N, Savoian M, Gardner P, Biggs P. 2019. Genomic correlate of extraintestinal infection are linked

- with changes in cell morphology in *Campylobacter jejuni*. Microbial Genomics 2019;5 (2).
71. Whitehouse CA, Zhao S, Tate H. 2018. Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* species: Mechanisms and genomic epidemiology. Adv Appl Microbiol. 2018; 103:1-47
  72. Wimalarathna HM, Richardson JF, Lawson AJ, Elson R, Meldrum R, Little CL, Maiden MC, McCarthy ND, Sheppard SK. 2013. Widespread acquisition of antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates from UK retail poultry and evidence for clonal expansion of resistant lineages. BMC Microbiol.13: 160
  73. Xinfeng H, Xingai G, Hang Z, Jiakang L, Xuelin H, Yiping W, Qi0n Z, Xiabo H, Qigui Y, Yong H, Sanjie C, Rui W, Xiaoping M, Likou Z. 2019. Prevalence, antimicrobial resistance profiles and virulence-associated genes of thermophilic *Campylobacter spp.* isolates from ducks in Chinese slaughterhouse. Food Control, Volume 104, October 2019, Pages 157-166
  74. Yahara K, Meric G, Taylor A, De Vries S, Murray S, Pascoe B, Mageiros L, Torralbo A, Vidal A, Ridley A, Komukai S, Wimalarathna H, Cody A, Colles F, McCarthy N, Harris D, Bray J, Jolley K, Maiden M, Bentley S, Parkhill J, Bayliss C, Grand A, Maskell D, Didelot X, Kelly D, Sheppard S. 2017. Genome-wide association of functional traits linked with *Campylobacter jejuni* survival from farm to fork. Environ Microbiol. 2017 Jan;19(1):361-380
  75. Yao H, Lui D, Wang Y, Zhang Q, Shen Z. 2017. High prevalence and predominance of the aph (2'')-if gene conferring aminoglycoside resistance in campylobacter. Antimicrobial agents and chemotherapy 61.
  76. Yoo J, Choi N, Bae Y, Lee J, Lee S. 2014. Development of a selective agar plate for the detection of *Campylobacter spp.* in fresh produce. International Journal of Food Microbiology, 189, 67–74.
  77. Zumbado L, Arévalo A, Donado M, Romero J. 2014. Diagnóstico molecular de *Campylobacter* en la cadena avícola destinada para consumo humano en Costa Rica. Agron. Mesoam. 25(2): 357-363
  78. Zhang A, Song L, Liang H, Gu Y, Zhang C, Liu X, Zhang J, Zhang M. 2016. Molecular subtyping and erythromycin resistance of *Campylobacter* in china. J Appl Microbiol. 2016 jul;121(1):287-93.

79. Zhang T, Cheng Y, Luo Q, Lu Q, Dong J, Zhang R, Wen G, Wang H, Luo L, Wang H, Liu G, Shao H. 2017. Correlation between gyrA and CmeR box polymorphism and fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* isolates in China. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
80. Zhao S, Mukherjee S, Chen Y, Li C, Young S, Warren M, Abbott J, Friedman S, Kabera C, Karlsson M, McDermott P. 2015. Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 70: 1314-1321.
81. Zhao S, Tyson G, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S, Lam C, Folster J, Whichard J, McDermott P. 2016. Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology* Jan 2016, 82 (2) 459-466.